

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTRATEGIAS DE VEHICULIZACIÓN DE
TRACOLIMUS (FK506) PARA SU
ADMINISTRACIÓN VÍA INHALATORIA:
ESTUDIOS EN TRASPLANTE DE PULMÓN
EXPERIMENTAL.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Almudena López Sánchez

Bajo la dirección de la doctora

Cristina Casals Carro

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-9491-5

© Almudena López Sánchez, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**ESTRATEGIAS DE VEHICULIZACIÓN DE
TACROLIMUS (FK506) PARA SU ADMINISTRACIÓN
VÍA INHALATORIA. ESTUDIOS EN TRANSPLANTE DE
PULMÓN EXPERIMENTAL**

TESIS DOCTORAL DE

ALMUDENA LÓPEZ SÁNCHEZ

Directora: **Dra. Cristina Casals Carro**

Madrid, 2010

A mis padres

A Alfredo

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del programa de becas predoctorales de la Comunidad de Madrid (CAM 5963/2004), al Contrato Artículo 83 L.O.U con la compañía farmacéutica Fujisawa GmbH (ahora denominada Astellas Pharma) (Alemania), a los proyectos de investigación SAF2006-04434 y SAF2009-07810 del Ministerio de Ciencia e Innovación, al programa de actividades de I + D entre grupos de investigación de la Comunidad de Madrid en Biociencias (S2006/BIO-0260) y al soporte del CIBER de Enfermedades Respiratorias (Instituto de Salud Carlos III -CB06/06/0002).

AGRADECIMIENTOS

Siempre pensé que una vez llegado este punto habría superado el miedo de la página en blanco, pero hay tantas personas a las que agradecer tantas cosas durante estos siete años que me da miedo olvidarme de alguien. Si es tu caso, perdóname y muchas gracias!

En primer lugar mi más sincero agradecimiento a mi directora de Tesis, la Dra. Casals Carro. Muchas gracias Cristina por haberme dado la oportunidad de entrar a formar parte de esta familia que es un grupo de investigación, por formarme como investigadora y por toda tu ayuda en la elaboración de esta memoria. Y muchas gracias también por tus consejos, por las conversaciones extra-profesionales y por haber hecho de mí una persona más fuerte.

A continuación me gustaría recordar a alguien que me ayudó a dar mis primeros pasos en la investigación celular, el Dr. Rafael García Cañero. Muchas gracias Rafa por tus conocimientos, por tu paciencia, por esa tranquilidad que sabías transmitir y porque sin ti esta tesis no hubiera sido posible.

Parte de los experimentos de esta tesis se realizaron en colaboración con los Servicios de Cirugía Experimental y Cirugía Torácica de la Clínica Puerta de Hierro de Madrid, dirigidos por el Dr. Castillo-Olivares y el Dr. Varela, respectivamente. Mi más sincero agradecimiento a ambos, así como a todas las personas que de una manera u otra estuvieron implicadas en la realización de los trasplantes pulmonares, y en especial a la Dra. Lourdes Álvarez y al Dr. Martín Santos. Muchas gracias Lourdes por transmitirme tu ilusión por el proyecto que estábamos desarrollando y por esas palabras de apoyo en momentos difíciles. Y muchas gracias Martín por esos buenos momentos pasados en el quirófano.

El resto de esta tesis se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid, al que quiero agradecer el haberme permitido hacer uso de su infraestructura durante todo este tiempo.

Son muchas las personas con las que he coincidido en el laboratorio durante estos años y a las que tengo mucho que agradecer. Muchas gracias Olga por transmitirme tu sabiduría en el campo de la biofísica y por tu paciencia al encontrarte de frente a alguien tan "bio" como yo. Gracias también a Rosa, Noemí y Sergio por vuestros conocimientos en Biología Celular. Gracias Victor por tu ayuda en la realización de los experimentos con bacterias y por tu apoyo en la etapa final de la tesis. Gracias Chami por hacer del labo un lugar más alegre y por tu entusiasmo contagioso. Gracias al Dr. Jesús Pérez-Gil y a su gente, en especial a Azu, Ali, Vicky y Lu por esas palabras tan reconfortantes en los momentos más difíciles. Y dejo para el final el agradecimiento a los que se han convertido en mis amigos y compañeros diarios de

fatigas: Fer, por las miles de conversaciones compartidas; Belén, por esos consejos que me hacen ver las cosas desde otra perspectiva; Carmen, porque siempre estás pendiente de que esté bien; Eli P, por ese sentido del humor tan particular; Eli J, porque volver a encontrarte después de tanto tiempo ha sido una de las cosas geniales de entrar en el labo; Vir, porque a pesar de que no nos conocemos desde hace mucho parece que nos conociéramos de toda la vida; y qué decir de Jana y Bar. Muchísimas gracias Jana por ayudarme en todo, tanto a nivel profesional como personal, y porque siempre has estado ahí cuando lo he necesitado. Y Bar, mil gracias por ser mi gran apoyo durante estos años, por tirar de mí en los malos momentos y por compartir los buenos.

También tengo que dar las gracias a mi laboratorio de acogida, el L5. Muchas gracias a Nano, Feli, Olly, María, Tere, Vicky, Laurita, Tomi y Esther por haberme hecho sentir como en casa y por esos nevaquitos que me levantaban el ánimo. Y muchas gracias a mis chicos, Jumi, Javi, Chule y Dani, por tantos buenos momentos vividos. Gracias también a la gente del L1, a Tere y Regina por interesarse tanto por la evolución de esta tesis, y a Carmen, Julia y Rosa.

Durante todos estos años mis amigos de toda la vida han sabido hacerme desconectar de este mundillo y con ellos he vivido mil y una historias. Muchísimas gracias a todos ellos, y en especial a Cris, porque como ella me escribió una vez, siempre has estado cerca.

Me gustaría agradecer a mi familia el haberse preocupado por mí durante todos estos años y en especial a mis sobris por saber alegrarme la vida en momentos complicados.

Finalmente, me gustaría dedicar esta tesis a las personas más importantes de mi vida, Alfredo y mis padres, Lourdes y Luis Manuel. Muchas gracias Alfredo por estar a mi lado, por compartir el camino conmigo y por aguantarme cuando me vuelvo insostenible. Y muchas gracias papás por haber hecho de mí la persona que soy ahora, por orientarme dejándome libertad para tomar mis propias decisiones y por creer siempre en mí. Nunca habría llegado hasta aquí si no hubiera sido por vosotros.

...Si de noche lloras por no ver el sol, las lágrimas te impedirán ver las estrellas...

ABREVIATURAS

γ	tensión superficial
π	presión superficial
ARDS	síndrome de distrés respiratorio agudo
CRD	dominio de reconocimiento de carbohidratos
CRP	proteína C reactiva
DAG	di-acil-glicerol
DMSO	dimetilsulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenilhidracina
DPA	daño pulmonar agudo
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
EDTA	ácido etilen-diamino tetra-acético
EIPA	5-(N-etil-N-isopropil)-amilorida
FBS	suero bovino fetal
FKBP	proteínas de unión a FK506
HSA	albúmina de suero humana
IL	interleuquina
IP ₃	inositol-tri-fosfato
K _d	constante de disociación
LA	agregados grandes del surfactante pulmonar
LBA	lavado broncoalveolar
L-FK506	tacrolimus liposomal
LPS	lipopolisacárido bacteriano
l-LPS	lipopolisacárido bacteriano liso
Re-LPS	lipopolisacárido bacteriano rugoso
MRP	proteína de multirresistencia a drogas
NF-AT	factor nuclear de linfocitos T activados
NF- κ B	factor nuclear kappa B
PAF	factor activador de plaquetas
PBS	tampón fosfato salino
pc	peso corporal
PC	fosfatidilcolina

PE	fosfatidiletanolamina
PG	fosfatidilglicerol
PHA	fitohemaglutinina
PI	fosfatidilinositol
PMA	forbol-miristato-acetato
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol
PPi _{asa}	peptidil <i>cis-trans</i> isomerasa
PS	fosfatidilserina
SA	agregados pequeños del surfactante pulmonar
SDS	dodecil sulfato sódico
SM	esfingomielina
SM _{asa}	esfingomielinasa
SP-A	proteína A del surfactante pulmonar
SP-B	proteína B del surfactante pulmonar
SP-C	proteína C del surfactante pulmonar
SP-D	proteína D del surfactante pulmonar
TNF- α	factor de necrosis tumoral α

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. COMPOSICIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR	14
1.1. Composición lipídica.....	14
1.2. Composición proteica.....	15
1.2.1. SP-A	15
1.2.2. SP-D	18
1.2.3. SP-B.....	20
1.2.4. SP-C.....	21
2. METABOLISMO DEL SURFACTANTE PULMONAR	22
2.1. Síntesis del surfactante pulmonar.....	23
2.1.1. Síntesis de los lípidos	23
2.1.2. Síntesis de las proteínas.....	24
2.2. Ensamblaje y secreción	28
2.3. Adsorción interfacial	30
2.4. Degradación y reciclaje.....	30
2.5. Regulación.....	31
3. FUNCIONES DEL SURFACTANTE PULMONAR	32
3.1. Funciones específicas de los lípidos.....	35
3.2. Funciones específicas de las proteínas	37
3.2.1. SP-A	37
3.2.2. SP-D	40
3.2.3. SP-B.....	41
3.2.4. SP-C.....	42
4. SURFACTANTE PULMONAR Y PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS	43
4.1. Síndrome de distrés respiratorio agudo	43
4.2. Daño por isquemia-reperfusión tras el trasplante de pulmón.....	44
4.2.1. Estrategias para prevenir o tratar el daño por isquemia-reperfusión	48
5. TACROLIMUS	49
5.1. Características estructurales del tacrolimus	49

5.2. Mecanismo de acción del tacrolimus	50
5.3. Usos terapéuticos del tacrolimus	54
5.4. Uso del tacrolimus en trasplante de pulmón	58
OBJETIVOS	61
CAPÍTULO 1: Efecto antiinflamatorio de tacrolimus encapsulado en nanoliposomas de composición similar a las membranas de surfactante pulmonar	
1. RESUMEN	67
2. INTRODUCCIÓN	67
3. MATERIALES Y MÉTODOS	69
3.1. Condiciones de cultivo	69
3.2. Diferenciación de células U937	72
3.3. Preparación del tacrolimus liposomal o de vesículas de fosfolípidos	72
3.4. Estimulación de macrófagos	72
3.5. Ensayos de proliferación celular	73
3.6. Ensayo de viabilidad celular	73
3.7. Microscopía de fluorescencia	74
3.8. Extracción nuclear	74
3.9. Cuantificación de TNF- α	75
3.10. Ensayo de actividad de NF- κ B	75
3.11. Determinación del transporte mediado por proteínas de multirresistencia a drogas	76
3.12. Análisis estadísticos	77
4. RESULTADOS	78
4.1. Actividad antiinflamatoria de tacrolimus	78

4.2. Entrada de tacrolimus libre y tacrolimus liposomal en la célula.....	81
5. DISCUSIÓN	85

CAPÍTULO 2: Efecto beneficioso de la administración intratraqueal de tacrolimus liposomal en trasplante de pulmón experimental

1. RESUMEN	93
2. INTRODUCCIÓN	93
3. MATERIALES Y MÉTODOS	95
3.1. Preparación de FK506 liposomal o de vesículas de fosfolípidos.....	95
3.2. Animales y grupos experimentales	96
3.3. Técnica quirúrgica.....	97
3.4. Instilación de FK506 liposomal, liposomas o suero salino	100
3.5. Grupos de pulmones estudiados	100
3.6. Parámetros cardiovasculares y hemodinámicos	101
3.7. Parámetros gasométricos y ventilatorios	102
3.8. Procesamiento del lavado broncoalveolar	103
3.9. Cuantificación de tacrolimus en sangre arterial y lavado broncoalveolar	104
3.10. Ensayos citométricos a partir del precipitado celular del lavado broncoalveolar	104
3.11. Aislamiento de los agregados del surfactante (grandes y pequeños)	106
3.12. Extracción lipídica.....	106
3.13. Cuantificación de proteínas totales	107
3.14. Cuantificación de fosfolípidos totales	107
3.15. Cuantificación de la proteína C reactiva	108
3.16. Cuantificación de TNF- α	108
3.17. Cuantificación de lípidos oxidados	109
3.18. Cuantificación de proteínas oxidadas.....	109

3.19. Determinación de la actividad esfingomielinasa ácida	110
3.20. Medidas de SP-A, SP-B y SP-C por Western blot.....	110
3.21. Ensayos de adsorción interfacial	111
3.22. Análisis estadísticos	112
4. RESULTADOS	112
4.1. Respuestas fisiológicas.....	112
4.2. Incorporación de L-FK506 instilado en la sangre arterial y el LBA de los animales receptores	114
4.3. Marcadores de daño alveolar.....	115
4.3.1. Alteraciones celulares.....	115
4.3.2. Edema y oxidación de proteínas	117
4.3.3. Marcadores de inflamación	118
4.4. Propiedades bioquímicas y biofísicas del surfactante pulmonar.....	120
4.4.1. Composición del surfactante pulmonar	120
4.4.2. Funcionalidad del surfactante pulmonar.....	123
5. DISCUSIÓN	127

CAPÍTULO 3: Caracterización de los complejos tacrolimus/SP-A, proteína mayoritaria del fluido alveolar

1. RESUMEN	135
2. INTRODUCCIÓN	135
3. MATERIALES Y MÉTODOS	138
3.1. Aislamiento de la SP-A	138
3.2. Estudios de unión SP-A/FK506 mediante dispersión de luz dinámica.....	139
3.3. Estudios de unión SP-A/FK506 en soporte sólido	139
3.4. Estudios de unión SP-A/DPPC en soporte sólido en presencia de FK506	140
3.5. Ensayos de fluorescencia intrínseca de la SP-A en presencia de FK506.....	140
3.6. Ensayos de dicroísmo circular de la SP-A en presencia de FK506	140

3.7. Ensayos de autoasociación de la SP-A en presencia de FK506.....	141
3.8. Ensayos de agregación de vesículas inducida por SP-A en presencia de FK506	141
3.9. Ensayos de agregación de Re-LPS inducido por SP-A en presencia de FK506	142
3.10. Ensayos de adsorción interfacial de membranas de surfactante pulmonar conteniendo SP-B y SP-C. Efecto de SP-A y/o tacrolimus	143
3.11. Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano inducido por SP-A en presencia de FK506.....	143
3.12. Ensayos de muerte bacteriana inducido por SP-A en presencia de FK506	143
3.13. Condiciones de cultivo de células Jurkat	144
3.14. Estimulación de células Jurkat	145
3.15. Cuantificación de IL-2	145
4. RESULTADOS	145
4.1. Estudios de unión tacrolimus/SP-A	145
4.1.1. Estudios de unión en solución por dispersión de luz dinámica	145
4.1.2. Estudios de unión en soporte sólido	148
4.2. Efecto del tacrolimus sobre la estructura de la SP-A	149
4.2.1. Características fluorescentes de la SP-A unida al tacrolimus	149
4.2.2. Espectros de dicroísmo circular de la SP-A unida al tacrolimus.....	150
4.3. Efecto del tacrolimus sobre las propiedades de la SP-A.....	152
4.3.1. Autoasociación de la SP-A	152
4.3.2. Agregación de vesículas de fosfolípidos	152
4.1.2. Agregación de LPS rugoso	154
4.4. Efecto del tacrolimus sobre las funciones de la SP-A.....	155
4.4.1. Efecto de la SP-A sobre la adsorción interfacial de membranas de surfactante.....	155
4.4.2. Actividad antimicrobiana de la SP-A	157
4.4.3. Actividad inmunosupresora de la SP-A	159
5. DISCUSIÓN	162

CAPÍTULO 4: Actividad antiinflamatoria de los complejos tacrolimus/ SP-A sobre macrófagos

1. RESUMEN	171
2. INTRODUCCIÓN	171
3. MATERIALES Y MÉTODOS	173
3.1. Aislamiento de SP-A.....	173
3.2. Condiciones de cultivo, diferenciación y estimulación de células U937	173
3.3. Extracción nuclear.....	173
3.4. Cuantificación de TNF- α	173
3.5. Ensayo de actividad de NF- κ B.....	174
3.6. Ensayo de captura de calceína.....	174
3.7. Análisis estadísticos	174
4. RESULTADOS	174
4.1. Actividad antiinflamatoria.....	174
4.2. Entrada de tacrolimus libre o unido a SP-A en la célula.....	178
5. DISCUSIÓN	181
 CONCLUSIONES	 185
 BIBLIOGRAFÍA	 189

INTRODUCCIÓN

El aparato respiratorio es el encargado de realizar el intercambio gaseoso entre el aire y la sangre. Está formado por las vías respiratorias y por los pulmones. Los pulmones se localizan en la cavidad pleural y se encuentran recubiertos de líquido pleural para suavizar los movimientos respiratorios.

Se compone de cavidad nasal, faringe y tráquea, la cual se ramifica en bronquios, bronquiolos y conductos alveolares hasta llegar a los sacos alveolares, donde se encuentran los alveolos. Las primeras 16 ramificaciones forman la zona de conducción de las vías respiratorias que transportan el aire desde y hacia el exterior (bronquios y bronquiolos). Las 7 restantes forman las zonas de transición (bronquiolos respiratorios y conductos alveolares) y respiratoria donde se encuentran los alveolos, que constituyen la unidad funcional de intercambio respiratorio junto con los capilares. Las crecientes divisiones producen un enorme incremento en el área transversal que pasa de los 2.5 cm² de la tráquea hasta unos 11800 cm² en los alveolos. Hay aproximadamente 300 millones de alveolos en los pulmones humanos y el área de las paredes alveolares en contacto con los capilares es de unos 70 m², lo que facilita el intercambio gaseoso.

La unidad alveolo-capilar está constituida por tres capas: epitelial, intersticial y endotelial (Figura 1).

El epitelio alveolar está formado por dos tipos celulares:

- Neumocitos tipo I: son células que cubren el 90% de la superficie alveolar. Son planas y alargadas y forman una delgada barrera a través de la cual se realiza el intercambio gaseoso (Crapo *et al.* 1982). Son células incapaces de dividirse que contienen sólo pequeñas cantidades de orgánulos y cuya actividad metabólica es muy limitada.
- Neumocitos tipo II: se encuentran en mayor número que los neumocitos tipo I, aunque debido a su menor extensión cubren sólo un 10% de superficie alveolar. Son células polarizadas con morfología típicamente secretora, con aspecto cuboide y con microvellosidades en su cara apical (Whitsett *et al.* 1985). Son capaces de dividirse y diferenciarse a neumocitos tipo I. Estas células son las responsables de la síntesis y secreción del surfactante pulmonar y contribuyen también a minimizar la cantidad de líquido presente en los alveolos al transportar solutos, junto con agua, fuera del espacio aéreo alveolar.

Por encima de la superficie alveolar se encuentra una fina película de líquido, que se secreta y absorbe a partir de dos procesos antagonistas: la absorción se debe a un proceso osmótico de transporte activo de sodio, mientras que la secreción de líquido se debe al transporte activo de cloro hacia el exterior de las células epiteliales alveolares. Este líquido alveolar hace necesaria la presencia de un surfactante para disminuir la tensión superficial que de otra manera se produciría en la interfase aire-líquido.

En la superficie alveolar y en contacto con las células epiteliales se encuentran los macrófagos alveolares, principales responsables de la respuesta inmune innata celular. Su función principal consiste en fagocitar bacterias y otras partículas inhaladas que acceden al espacio alveolar, manteniendo de esta forma el pulmón estéril. Estos fagocitos son eliminados a través de una migración por acción del sistema ciliar hasta la faringe o hacia el intersticio donde son eliminados a través del sistema linfático. Además de como células fagocitarias, estos macrófagos alveolares intervienen activamente en la respuesta del pulmón frente a patógenos a través de la síntesis de mediadores inflamatorios. En condiciones normales, estos macrófagos presentan una débil respuesta frente a estímulos, lo que facilita que el pulmón se encuentre poco inflamado a pesar de la gran cantidad de sustancias nocivas que llegan desde el exterior al espacio alveolar. Parece que esta débil respuesta podría ser debida, al menos en parte, a las interacciones neumocito-macrófago, contacto que se pierde al activarse los macrófagos como consecuencia de la presencia de patógenos o patrones moleculares asociados a patógenos (Lambrecht 2006).

Por debajo del epitelio se encuentra la capa intersticial que está formada por las láminas basales del epitelio alveolar y endotelial y por un tejido conectivo intermedio de fibras elásticas y de colágeno donde hay presentes células mesenquimáticas (fibroblastos y miofibroblastos) y del sistema inmune (linfocitos, macrófagos intersticiales y células cebadas).

Debajo de la capa intersticial se encuentra el endotelio capilar, que forma parte de la red capilar que irriga el pulmón por donde fluyen las células sanguíneas que transportan e intercambian los gases.

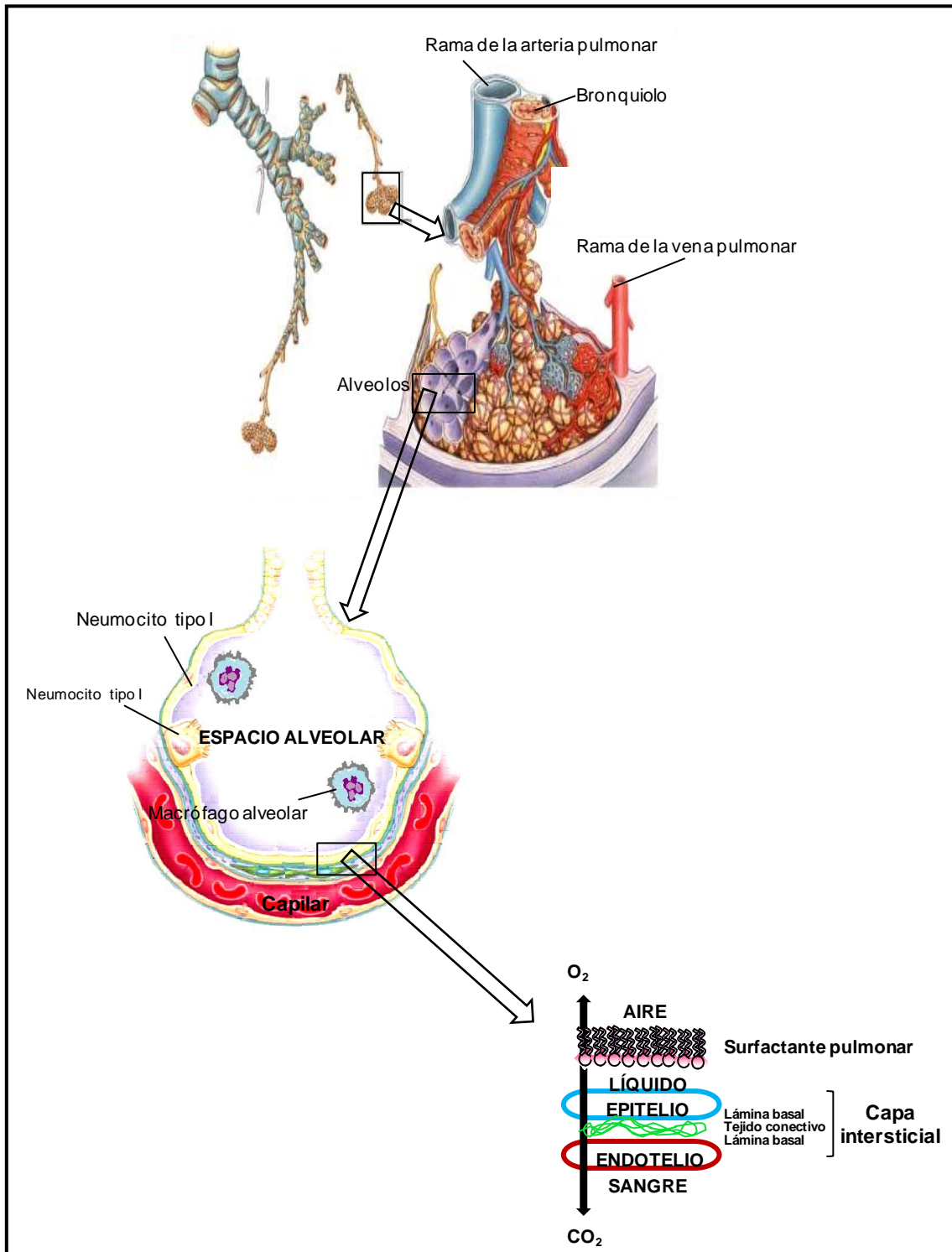


Figura 1: Representación esquemática de un saco alveolar (arriba) un alveolo (centro) y una unidad alveolo-capilar (abajo).

1. COMPOSICIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR

El surfactante pulmonar es un complejo lipoproteico muy conservado entre especies que se encuentra recubriendo toda la interfase aire-líquido de la superficie alveolar. Su principal función consiste en prevenir el colapso alveolar que, sin la presencia de este material tensoactivo, se produciría durante la espiración. Además, tiene un importante papel en la defensa inmune innata del pulmón frente a patógenos y un efecto antiedematoso, ya que contribuye a evitar que el líquido intersticial penetre en el espacio alveolar (Hohlfeld *et al.* 1997). La importancia del surfactante pulmonar queda de manifiesto en el hecho de que existen numerosas patologías respiratorias asociadas a su déficit o alteración.

Aproximadamente el 90% del peso total está constituido por lípidos, y alrededor de un 10% por proteínas (Figura 2)

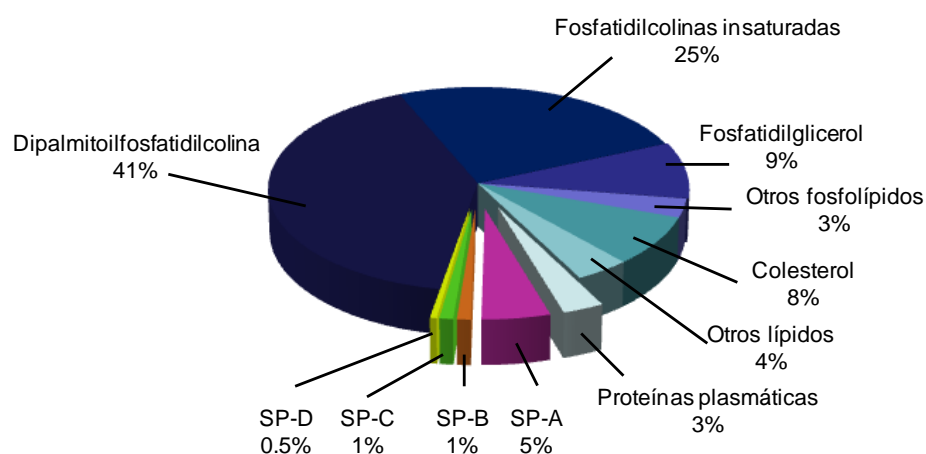


Figura 2: Composición del surfactante pulmonar. SP-A, B, C y D: proteínas A, B, C y D del surfactante pulmonar.

1.1. Composición lipídica

Aproximadamente el 40% del contenido total de surfactante corresponde a la especie molecular disaturada de la fosfatidilcolina (PC), la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfolípido responsable de la actividad interfacial del surfactante, ya que sus dos cadenas de acilo saturadas le permiten formar una monocapa altamente empaquetada

capaz de reducir al mínimo la tensión superficial de la interfase aire-líquido evitando el colapso alveolar durante la espiración (Bernhard *et al.* 2001) (Lang *et al.* 2005).

El surfactante, sin embargo, contiene cantidades casi equimolares de fosfolípidos disaturados e insaturados. Esta particular composición lipídica hace posible la coexistencia de microdominios ordenados y fluidos que son necesarios para su función. Los fosfolípidos insaturados (PC, fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE)) facilitan el transporte del material tensoactivo (DPPC) desde la subfase a la interfase aire líquido. Otra característica de este complejo es que cuenta con alrededor de un 10% de fosfolípidos aniónicos (sobre todo PG y, en algunas especies, PI) que están implicados en interacciones con los péptidos anfipáticos del surfactante (SP-B y SP-C), con densidad de carga positiva (Veldhuizen and Haagsman 2000).

Una pequeña parte del complejo está constituido por los lípidos neutros, siendo el más abundante el colesterol, que representa el 8% del peso total del surfactante. Además del colesterol también hay presentes pequeñas cantidades de monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y ácidos grasos libres (Veldhuizen *et al.* 1998).

1.2. Composición proteica

El surfactante pulmonar también consta de un componente proteico, formado por las cuatro proteínas específicas del surfactante pulmonar, dos hidrofílicas (SP-A y SP-D) y dos hidrofóbicas (SP-B y SP-C) (Goerke 1998). Además, junto con el surfactante pulmonar también se aíslan proteínas inespecíficas, la mayoría de origen plasmático, entre las que se encuentran la albúmina, lipoproteínas séricas, inmunoglobulinas, factores de crecimiento o citoquinas (Hawgood 1997).

1.2.1. SP-A

Se trata de la proteína mayoritaria del surfactante pulmonar. Pertenece a la familia de las colectinas, ya que posee un dominio lectina tipo C (que une azúcares en presencia de calcio) en el extremo C-terminal y un dominio de colágeno en el extremo N-terminal (Holmskov *et al.* 1995).

La estructura primaria de la SP-A se encuentra muy conservada y está constituida por cuatro dominios: 1) segmento N-terminal, implicado en la formación de puentes

disulfuro intercatenarios; 2) dominio colagénico, caracterizado por 23 repeticiones del tripéptido glicina-X-Y, con una interrupción aproximadamente a la mitad del dominio; 3) región de conexión o cuello que sirve de nexo de unión entre los dominios colagénico y C-terminal; 4) dominio globular C-terminal, implicado en la unión a lípidos y carbohidratos.

La estructura cuaternaria de la SP-A consiste en un octadecámero cuyos monómeros, de 36 kDa, se asocian entre sí formando trímeros (estabilizados por la formación de la triple hélice de colágeno) y estos, a su vez, se ensamblan hexagonalmente mediante asociación lateral de hélices de colágeno (Figura 3, A.) El conjunto se estabiliza mediante la formación de puentes disulfuro en la región N-terminal (Haagsman *et al.* 1989). El octadecámero tiene un tamaño de entre 600-700 kDa y 20 nm de longitud y forma de ramo de flores debido a la torsión en el dominio de colágeno antes mencionada. El ensamblaje supratrimérico de la proteína es esencial para alguna de las funciones de la proteína (Sanchez-Barbero *et al.* 2005) (Sanchez-Barbero *et al.* 2007).

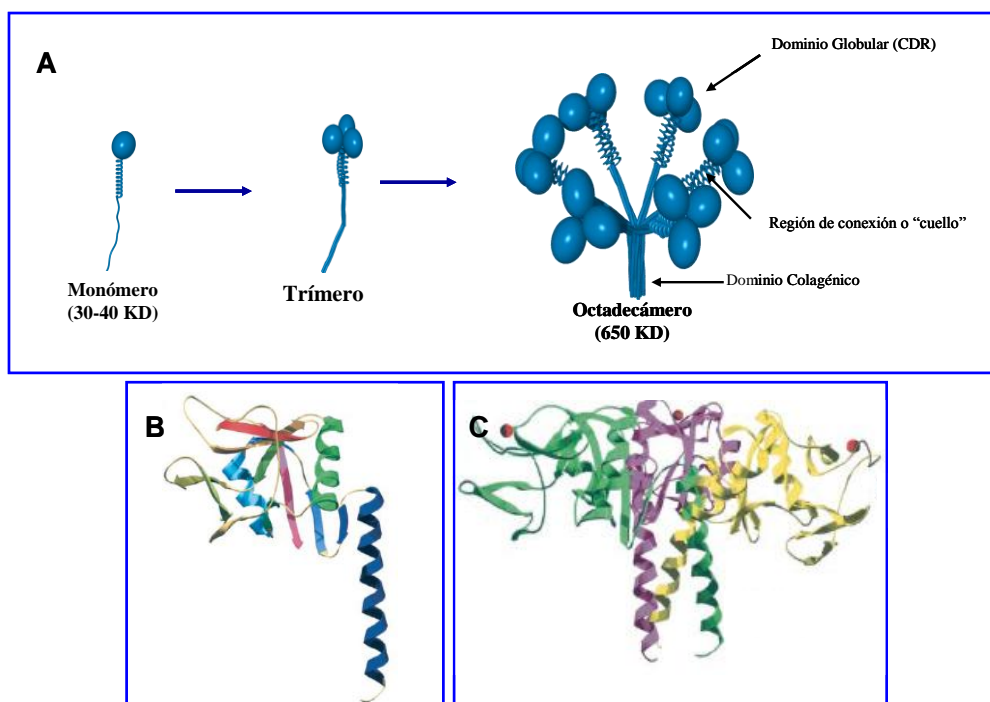


Figura 3: A. Modelo de la estructura monomérica, trimérica y octadecamérica de la SP-A. B. Estructura tridimensional del monómero. C. Estructura tridimensional del trímero. (Head *et al.* 2003)

- Segmento N-terminal: Está formado por 7 aminoácidos, incluyendo una Cys⁶ que participa en la formación de puentes disulfuro intercatenarios, lo cual es necesario para la correcta oligomerización de la proteína (McCormack *et al.* 1999) (Sanchez-Barbero *et al.* 2005)
- Dominio de colágeno: Está formado por 23 repeticiones Gly-X-Y, en el que el aminoácido Y suele ser hidroxiprolina (McCormack 1998). El dominio de colágeno de la SP-A humana se encuentra interrumpido por la secuencia Pro-Cys-Pro entre los tripletes 13 y 14, lo que da lugar a una torsión de 60° que es la responsable de la morfología en ramo de flores típica de la estructura cuaternaria octadecamérica (Voss *et al.* 1988). Este dominio está implicado en la unión a algunos receptores de la superficie celular (Garcia-Verdugo *et al.* 2005) (Sanchez-Barbero *et al.* 2007) y en la inhibición específica de la secreción de surfactante en neumocitos tipo II (McCormack *et al.* 1997). Se ha visto además que la longitud del segmento colagénico define las dimensiones del interespaciado entre membranas en las estructuras del surfactante (Palaniyar *et al.* 2001).
- Región de conexión o cuello: Dominio que sirve de nexo de unión entre el dominio globular y el de colágeno formado por 35 aminoácidos. Las tres cadenas polipeptídicas de la región se pliegan en forma de α -hélices anfipáticas enrolladas sobre sí mismas, lo que da lugar a una superhélice asociada por interacciones hidrofóbicas. Además de su papel en el plegamiento de la proteína, interviene en la unión selectiva de la SP-A a ligandos, ya que puede orientar los dominios globulares de los trímeros de SP-A (McCormack 1998).
- Dominio globular o de reconocimiento de carbohidratos (CRD): Se encuentra en el extremo C-terminal y está formado por 115 aminoácidos entre los que se encuentran 4 cisteínas que forman 2 puentes disulfuro intracatenarios (Cys²⁰⁴-Cys²¹⁸ y Cys¹³⁵-Cys²¹⁶) (Berg *et al.* 2000), así como 10 residuos invariantes y 18 muy conservados, comunes entre las lectinas de tipo C (Drickamer 1988). En 2003 se determinó la estructura por rayos X de trímeros de SP-A producidos a partir de la expresión del dominio globular y la región del cuello del gen de la SP-A de rata (Head *et al.* 2003) (Figura 3, B. y C.). El dominio globular está formado por 3 hélices α y 11 pequeñas regiones de tipo lámina β . Este dominio se dispone de forma prácticamente perpendicular al cuello, dando a la SP-

A una forma de T. Esta forma resulta muy adecuada para la interacción de la proteína con una gran cantidad de ligandos, en especial membranas lipídicas.

En el dominio globular existen al menos dos sitios de unión a calcio, uno de alta (sitio 2) y otro de baja afinidad (sitio 1) (Haagsman *et al.* 1990) (Sohma *et al.* 1992). Muy cerca del sitio 2 de unión a calcio (en las posiciones 191 y 213) se encuentran dos triptófanos que sirven como marcadores de cambios conformacionales en esta región. La unión de calcio al dominio globular produce un aumento de la fluorescencia intrínseca de la proteína, así como un desplazamiento al ultravioleta del máximo de emisión de fluorescencia, lo que indica que la unión de calcio produce un cambio conformacional en la proteína que vuelve más hidrofóbico el entorno de los residuos de triptófano (Garcia-Verdugo *et al.* 2003) (Sanchez-Barbero *et al.* 2005). Este cambio conformacional incrementa la resistencia a digestión por proteasas (Haagsman *et al.* 1990), aumenta la unión a lípidos, permite la unión a carbohidratos, la autoagregación de la proteína y la agregación de vesículas dependiente de SP-A (Casals *et al.* 1993) (Ruano *et al.* 1996) (Ruano *et al.* 2000). El sitio 2 de unión a calcio se encuentra localizado en el centro del sitio de unión a azúcares. La SP-A se une preferentemente a manosa y fucosa, aunque también a galactosa (Haagsman *et al.* 1987), azúcares que se encuentran presentes en la superficie de organismos patógenos. El dominio globular también está implicado en la unión a lípidos, preferentemente fosfolípidos cuya cabeza polar sea fosfocolina y los grupos acilo sean saturados de cadena larga, como la DPPC y la esfingomielina (Casals *et al.* 1993) (King *et al.* 1986), siendo las interacciones tanto a través de las cabezas polares (Yu *et al.* 1999) como de las cadenas de acilo (Kuroki and Akino 1991). La unión de SP-A a vesículas de DPPC es independiente de calcio, mientras que la unión a fosfolípidos ácidos requiere la presencia de éste (Casals *et al.* 1993) (Ruano *et al.* 1998) (Meyboom *et al.* 1999).

1.2.2. SP-D

Es una proteína hidrofílica que, al igual que la SP-A, pertenece a la familia de las colectinas. La estructura primaria presenta 4 dominios estructurales: 1) pequeño dominio N terminal; 2) dominio colagénico; 3) región de conexión o cuello que sirve de nexo de unión entre los dominios colagénico y C-terminal; 4) dominio globular C terminal, implicado en la unión a carbohidratos.

La estructura cuaternaria de la SP-D consiste en un dodecámero cruciforme de aproximadamente 600 kDa constituido por la asociación de cuatro trímeros a través de la región N terminal (Crouch 1998) (Figura 4).

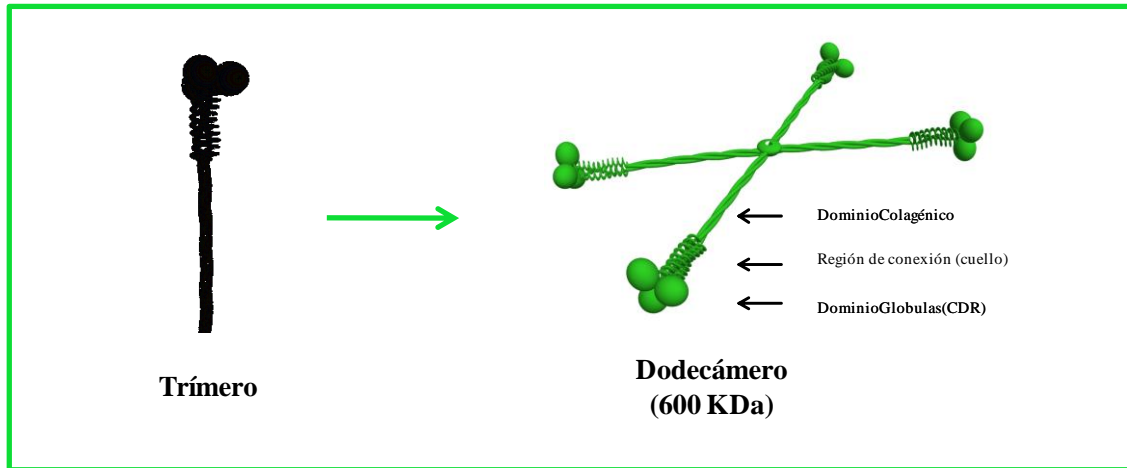


Figura 4: Modelo de la estructura trimérica y dodecamérica de la SP-D.

- Segmento N-terminal: Región formada por unos 25 aminoácidos, entre ellos Cys¹⁵ y Cys²⁰ que forman puentes disulfuro intercatenarios esenciales para la estabilización de los oligómeros de la proteína (Brown-Augsburger *et al.* 1996).

- Dominio de colágeno: Dominio formado por una secuencia de repeticiones del triplete Gly-X-Y, que, a diferencia de lo que ocurría en la SP-A, no se encuentra interrumpido, por lo que no presenta ningún acodamiento (Crouch 2000). Se encuentra plegado helicoidalmente formando una triple hélice junto a los dos dominios semejantes de otros dos monómeros, lo que resulta esencial para una correcta oligomerización de la proteína (Ogasawara and Voelker 1995).

- Región de conexión o cuello: Está localizada entre las cabezas globulares y la hélice de colágeno. En esta región se forma una estructura en superhélice a partir de tres α -hélices que sirve como núcleo de plegamiento de la triple hélice de colágeno (Hakansson *et al.* 1999)

- Dominio globular de reconocimiento de carbohidratos (CRD): Dominio localizado en el extremo C-terminal, similar al dominio globular de la colectina de unión a manosa (MBL) (Hakansson *et al.* 1999). Posee 4 Cys que forman dos puentes disulfuro

intracatenarios que estabilizan la estructura, y dos sitios de unión a calcio. Este dominio es el que le permite unirse a azúcares, y también a fosfatidilinositol y glucosilceramida, de una manera dependiente de calcio (Ogasawara and Voelker 1995). No obstante, se une débilmente a fosfolípidos por lo que no se encuentra asociada a las membranas de surfactante (Persson *et al.* 1989).

1.2.3. SP-B

La SP-B es una proteína hidrofóbica con carga neta positiva. Cada monómero, de unos 9 kDa, está formado por 79 aminoácidos y presenta 6 cisteínas que forman tres puentes disulfuro intramoleculares (Johansson and Curstedt 1997), que podrían contribuir a la estabilidad térmica de la proteína (Andersson *et al.* 1995). Además, parece que al menos uno de ellos podría ser indispensable para su funcionalidad (Beck *et al.* 2000). Tanto su secuencia, en la que están presentes nueve residuos hidrofóbicos, como su patrón de puentes disulfuro permiten relacionarla con la familia de las saposinas (Munford *et al.* 1995).

Los únicos datos disponibles en cuanto a la estructura de la SP-B están basados en el uso de técnicas espectroscópicas, tales como espectroscopía infrarroja (Pastrana-Rios *et al.* 1995), espectroscopía de fluorescencia o dicroísmo circular (Cruz *et al.* 1995). La estructura secundaria de la proteína presenta un alto contenido en α -hélice (Cruz *et al.* 1995). En base a la homología de secuencia y al alto contenido en α -hélice se ha sugerido que la SP-B podría compartir estructura tridimensional con la NK-lisina, la cual presenta varias hélices anfipáticas (Liepinsh *et al.* 1997).

La SP-B es un homodímero unido por un puente disulfuro intermolecular a través de la Cys⁴⁸ y estabilizado mediante la formación de enlaces de hidrógeno (Zaltash *et al.* 2000) (Figura 5, A.)

Debido a su fuerte carácter hidrofóbico la SP-B se encuentra siempre unida a lípidos. Estudios de espectroscopía infrarroja parecen indicar que las estructuras α -helicoidales de la proteína podrían orientarse de forma paralela al plano de la membrana (Vandenbussche *et al.* 1992), en posiciones más o menos superficiales. De esta forma las cabezas polares de los fosfolípidos interaccionarían con la cara más hidrofílica de las hélices anfipáticas de la proteína (los residuos cargados positivamente interaccionan

preferentemente con los fosfolípidos aniónicos, en especial el fosfatidilglicerol (Baatz *et al.* 1990)), mientras que el lado de la hélice rico en aminoácidos hidrofóbicos interaccionaría con las cadenas de acilo de los fosfolípidos mediante fuerzas de van der Waals (Figura 5, B.)

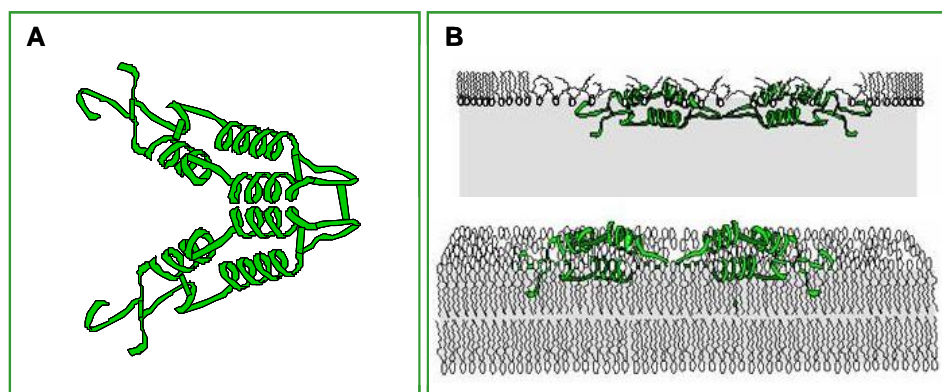


Figura 5: A. Modelo del homodímero de SP-B. B. Modelo de interacción de SP-B con monocapas y bicapas lipídicas.

1.2.4. SP-C

Es una proteína monomérica de tan sólo 35 aminoácidos y 4 kDa (Johansson and Curstedt 1997) y de una hidrofobicidad superior a la SP-B (Perez-Gil *et al.* 1993) (Figura 6, A.)

Está formada por dos regiones:

- Segmento C-terminal estructurado como una α -hélice hidrofóbica debido al elevado contenido en Val, Leu e Ile, que abarca los residuos 9-35 y que se dispone con orientación transmembrana en bicapas lipídicas (Vandenbussche *et al.* 1992) (Figura 6, B.). Tiene una longitud de 3.7 nm, lo que equivale exactamente al espesor de una bicapa de DPPC en estado fluido (Johansson *et al.* 1994).
- Segmento N-terminal formado por los residuos 1-9 de la proteína, que constituye la parte menos hidrofóbica en lo que se refiere a la estructura primaria y que posee un carácter catiónico por la presencia de Lys¹¹ y Arg¹². Estos aminoácidos son importantes en la unión de la proteína a fosfolípidos ácidos, y la neutralización de estas cargas afecta a las propiedades funcionales de la SP-C (Creuwels *et al.* 1995). La mayor parte de las secuencias de SP-C conocidas contienen Cys⁵ y Cys⁶ que se encuentran palmitoiladas,

lo que incrementa aún más la hidrofobicidad de la proteína. También se han encontrado formas no palmitoiladas que generan dímeros mediante la formación de puentes disulfuro intercatenarios, y que muestran una tendencia a agregar en forma de fibras amiloides (Gustafsson *et al.* 2001). En las posiciones 4 y 7 que rodean a las Cys se encuentran dos Pro que imponen una cierta conformación en la cadena polipeptídica, permitiendo la correcta disposición del segmento N-terminal y de las cadenas de ácido palmítico respecto de la hélice y la cadena lipídica (Johansson 1998) (Mulugeta and Beers 2003). Esto permite que la Lys¹¹ y la Arg¹² queden estratégicamente situadas en las proximidades de las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana, favoreciendo interacciones electrostáticas con fosfolípidos ácidos (Creuwels *et al.* 1995).

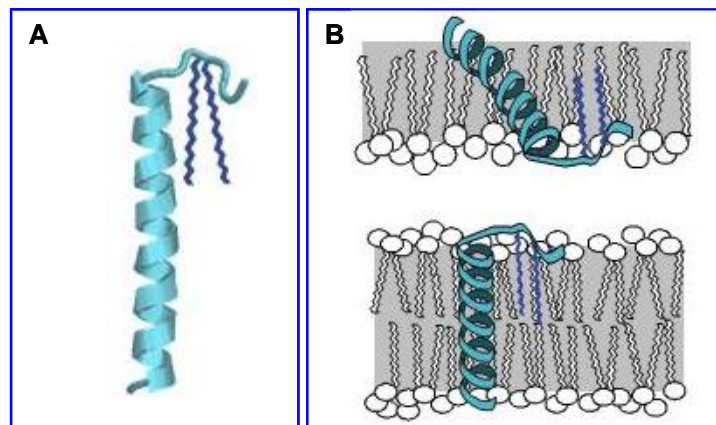


Figura 6: A. Modelo del monómero de SP-C. B. Modelo de interacción de SP-C con monocapas y bicapas lipídicas.

2. METABOLISMO DEL SURFACTANTE PULMONAR

El ciclo metabólico del surfactante pulmonar consta de las siguientes etapas (Figura 7):

1. Síntesis de los compuestos lipídicos y proteicos en los neumocitos tipo II
2. Ensamblaje y almacenamiento en los cuerpos lamelares y secreción regulada de éstos al fluido alveolar
3. Adsorción a la interfase aire-líquido y formación de la película interfacial
4. Endocitosis, degradación y/o reciclaje de sus componentes por parte de macrófagos alveolares y/o neumocitos tipo II

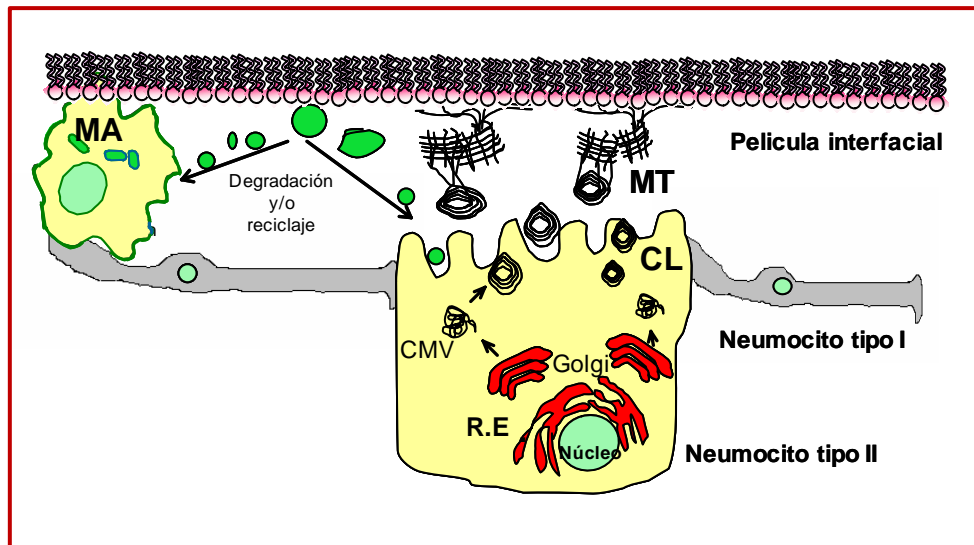


Figura 7: Representación esquemática del ciclo metabólico del surfactante pulmonar.

Su síntesis tiene lugar en los neumocitos tipo II. La ruta de secreción va desde el retículo endoplásmico (RE) hasta los cuerpos lamelares (CL) donde se almacena, pasando por el aparato de Golgi y los cuerpos multivesiculares (CMV). Una vez secretado a la hipofase acuosa se reorganiza formando la mielina tubular (MT) y se adsorbe a la interfase formando la película tensoactiva. Tras varios ciclos respiratorios, parte del surfactante es reciclado en los neumocitos tipo II, y el resto es degradado por los neumocitos tipo II o por los macrófagos alveolares (MA).

2.1. Síntesis del surfactante pulmonar

2.1.1. Síntesis de los lípidos

La síntesis de los fosfolípidos del surfactante tiene lugar en el retículo endoplásmico de los neumocitos tipo II. Los sustratos para su síntesis son la glucosa circulante y el glucógeno. La síntesis de todas las clases de glicerofosfolípidos requiere la formación de ácido fosfatídico, obtenido por acilación del glicerol-3-fosfato. El diacilglicerol generado es transformado por enzimas específicas para generar compuestos con diversas cabezas polares como PC, PG o PI (Batenburg and Haagsman 1998). La síntesis de novo de fosfatidilcolina en el pulmón se produce casi exclusivamente a través de la formación de CDP-colina, que es la etapa limitante y el principal punto de regulación de la ruta. Aproximadamente el 45% de la DPPC se obtiene a partir de la síntesis de novo y el resto procede de la modificación de especies insaturadas de PC

mediante reacciones de desacilación-reacilación en las que participan transacilasas específicas que añaden palmitato a la posición sn-2 (Batenburg and Haagsman 1998) (Van Golde and Casals 1997). La síntesis endógena de colesterol a partir de acetato o glucosa no cubre la cantidad de éste que hay en el surfactante, por lo que la principal fuente de colesterol presente en el surfactante se obtiene de la circulación a través de las lipoproteínas de baja densidad (Van Golde and Casals 1997).

2.1.2. Síntesis de las proteínas

Las cuatro proteínas específicas del surfactante pulmonar se sintetizan principalmente en los neumocitos tipo II. Con excepción de la SP-C, el resto de proteínas se expresan también en las células no ciliadas del epitelio broncoalveolar (Batenburg and Haagsman 1998) y en el tracto gastrointestinal (Fisher and Mason 1995). La SP-A también se ha encontrado en el oído medio humano (Madsen *et al.* 2003) y la SP-D en estómago, corazón y riñón (Fisher and Mason 1995).

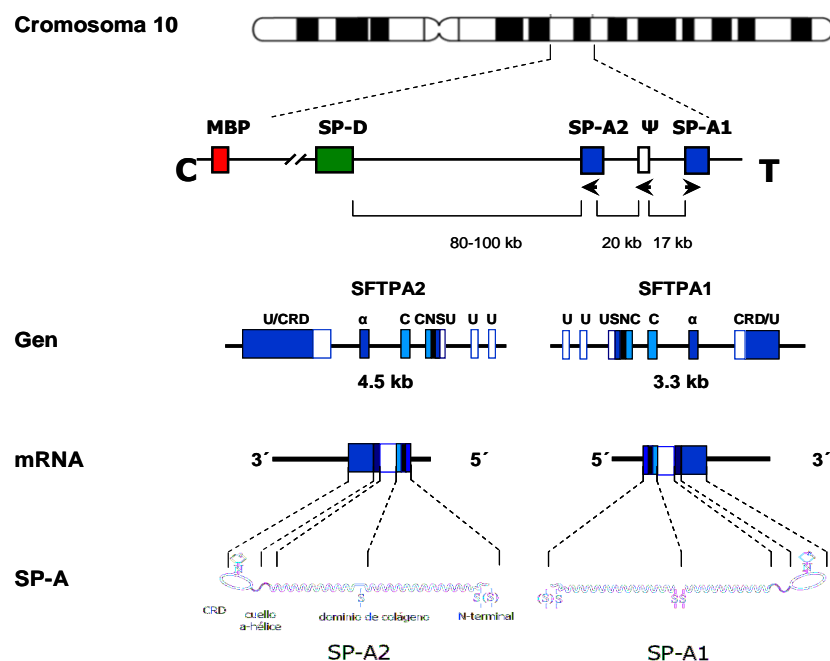


Figura 8: Esquema de la síntesis y el procesamiento de la SP-A. Las flechas indican la orientación de la transcripción. C: centrómero; T: telómero; S: péptido señal; U: secuencia no traducida; N: segmento N-terminal; C: dominio de colágeno; α: región de cuello; DG: dominio globular.

- Síntesis de SP-A:

La SP-A humana está codificada por dos genes , SP-A1 y SP-A 2, y un pseudogen no codificador, SP-A ψ , todos ellos localizados en el cromosoma 10 (Floros *et al.* 1996). Los genes SP-A1 y SP-A2 se encuentran muy próximos entre sí y presentan una orientación transcripcional opuesta, lo que sugiere que podrían compartir regiones reguladoras (Floros and Hoover 1998) (Figura 8).

El primer producto de la traducción de la proteína contiene un péptido señal, de entre 17 y 20 aminoácidos, en el extremo N-terminal, lo que permite su traslocación al lumen del retículo endoplásmico. Tras su síntesis, la SP-A sufre una serie de modificaciones postraduccionales, tanto en el retículo endoplásmico como en el Golgi, que incluyen la pérdida del péptido señal, glicosilación en Asp¹⁸⁷, hidroxilación de prolinas, formación de puentes disulfuro y oligomerización (Batenburg and Haagsman 1998) (McCormack 1998).

- Síntesis de SP-D:

El gen que codifica para la SP-D humana se encuentra en el cromosoma 10, cerca de los genes de la SP-A (Crouch 2000). Tras su síntesis, el precursor pierde el péptido señal en su traslocación al retículo endoplásmico y sufre glicosilaciones en residuos de Asn y glicosilaciones e hidroxilaciones en Lys del dominio de colágeno (Crouch *et al.* 1991) (Figura 9). Posteriormente se produce su oligomerización, con la correspondiente formación de puentes disulfuro intercatenarios, fundamental para su secreción al espacio alveolar.

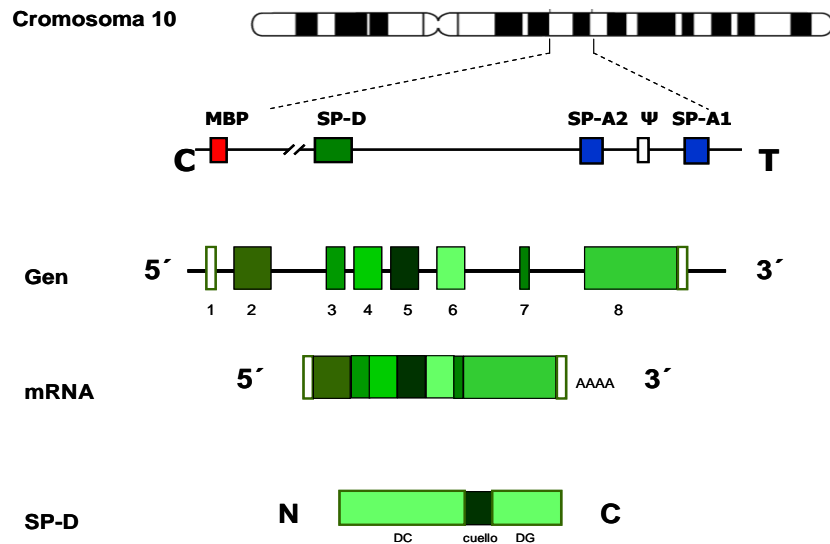


Figura 9: Síntesis y procesamiento de la SP-D. C: centrómero; T: telómero. 1-8 hace referencia a los exones. DG: dominio globular; DC: dominio colagénico.

- Síntesis de SP-B:

El gen que codifica para la SP-B está localizado en el brazo corto del cromosoma 2 (Emrie *et al.* 1988). El primer producto de su expresión es una preproteína de 381 aminoácidos que se trasloca al lumen del retículo endoplásmico gracias a los 23 residuos de la secuencia señal. Allí tiene lugar la glicosilación de uno o dos residuos de Asn con un oligosacárido rico en manosa y con el ácido siálico. Durante su transporte desde el aparato de Golgi hasta los cuerpos lamelares tienen lugar varios cortes proteolíticos que eliminan los propéptidos N- y C-terminales (Korimilli *et al.* 2000) (Wang *et al.* 2003) dando lugar a la proteína madura (Figura 10). El dominio N-terminal es necesario para el procesamiento y el tráfico intracelular de la proteína por la vía de secreción, además de facilitar su plegamiento, por lo que su ausencia hace que el precursor se acumule en el retículo endoplásmico (Lin *et al.* 1996). La pérdida del dominio C-terminal no parece afectar al tráfico de la proteína, aunque determinadas mutaciones en su secuencia generan graves alteraciones (Nogee *et al.* 2000).

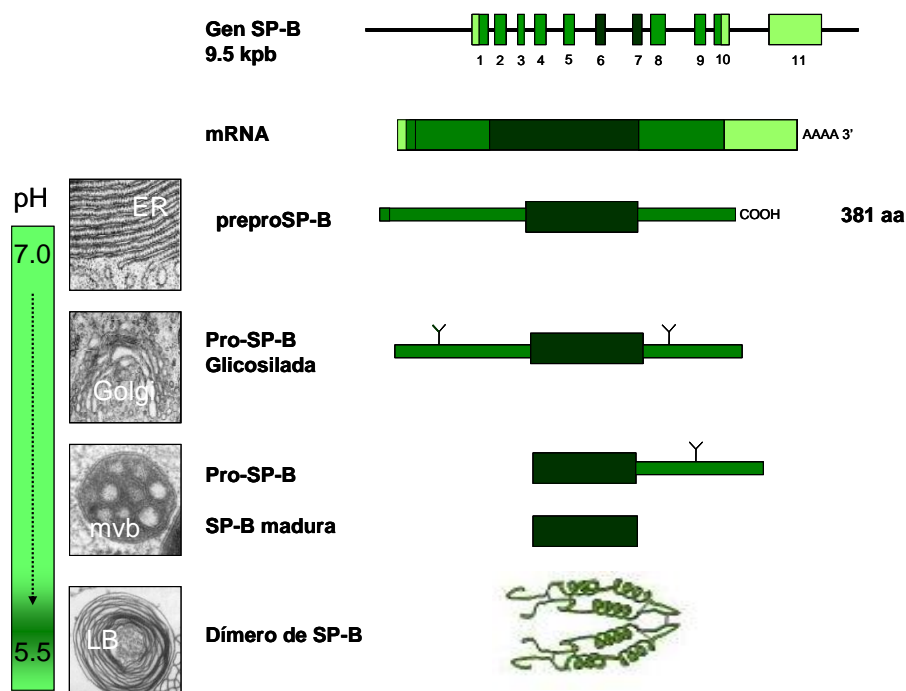


Figura 10: Síntesis y procesamiento de la SP-B. El procesamiento proteolítico de la SP-B desde la preproteína hasta la proteína madura comienza en el retículo endoplásmico (ER) y continúa en el aparato de Golgi y los cuerpos multivesiculares (mvb) hasta llegar a los cuerpos lamelares (LB). Este procesamiento es dependiente de pH, ya que comienza a pH 7 y termina a pH 5.5.

- Síntesis de SP-C

El gen que codifica para la SP-C se localiza en el brazo corto del cromosoma 8 (Glasser *et al.* 1988). El primer producto del gen es una preproteína de 197 aminoácidos (proSP-C) que se integra en la membrana del retículo endoplásmico, donde se produce la palmitoilación de Cys²⁸ y Cys²⁹. La proSP-C carece de péptido señal. Se ha propuesto que parte de la secuencia de la SP-C madura actuaría como péptido señal de proSP-C y por tanto como dominio de anclaje a membranas, integrándose en la membrana del retículo endoplásmico con orientación tipo II, con el extremo N-terminal expuesto hacia el citoplasma y el C-terminal al lumen (Keller *et al.* 1991). El segmento C-terminal de la proSP-C parece ser fundamental para un correcto plegamiento de la proteína, evitando el cambio conformacional α -hélice/lámina β del segmento transmembrana, lo que daría lugar a la agregación de la proteína, su acumulación en el retículo endoplásmico y muerte celular (Johansson *et al.* 2006; Casals *et al.* 2008). La proteína madura se obtiene tras la eliminación secuencial de las regiones N- y C-terminales en el

Golgi, cuerpos multivesiculares y cuerpos lamelares (Johansson and Curstedt 1997; Johansson 1998) (Figura 11).

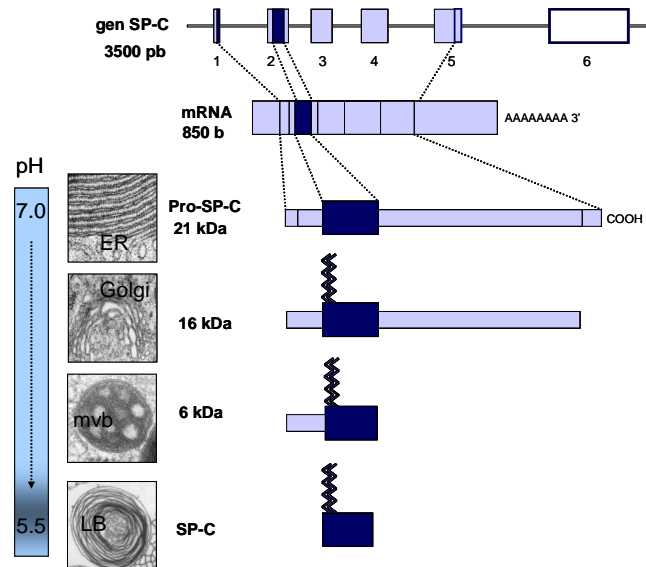


Figura 11: Síntesis y procesamiento de la SP-C. el procesamiento desde la preproteína hasta la proteína madura se produce desde el retículo endoplásmico (ER), y continúa en el Golgi, en los cuerpos multivesiculares (mvb) y termina en los cuerpos lamelares (LB) (Beers 1996). Es un proceso dependiente de pH, ya que comienza a pH 7 y termina a pH 5.5.

2.2. Ensamblaje y secreción

Los componentes del surfactante, a excepción de la SP-D (Crouch 1998), se almacenan en unas vesículas de secreción exclusivas de los neumocitos tipo II llamadas cuerpos lamelares, formados por múltiples capas de membranas lipoproteicas, altamente empaquetadas y dispuestas concéntricamente (Weaver *et al.* 2002). En el interior presentan un pH ácido y altas concentraciones de calcio (Wadsworth and Chander 2000). La secreción de surfactante requiere el transporte, mediado por elementos del citoesqueleto, de los cuerpos lamelares a la membrana apical de los neumocitos tipo II. En respuesta a diversos estímulos (expansión mecánica de los alveolos, ionóforos de calcio, agonistas β -adrenérgicos, purinérgicos y de vasopresina) los cuerpos lamelares se fusionan con la membrana plasmática de los neumocitos tipo II, liberándose por exocitosis a la subfase acuosa que recubre el epitelio alveolar (Frick *et al.* 2004) (Figura 12, A.). Una vez en la hipofase, parte del material de los cuerpos lamelares se

reorganiza para dar lugar a una estructura reticular altamente ordenada denominada mielina tubular (Figura 12, B.), aunque otra parte permanece aún después de ser secretada en forma de corpúsculos empaquetados durante largo tiempo, manteniendo su capacidad de adsorción rápida y eficiente en la interfase sin pasar por un estado de mielina tubular (Frick *et al.* 2004).

La mielina tubular consiste en una red tridimensional de túbulos con una sección cuadrada de 45-50 nm, constituidos por bicapas lipídicas (Batenburg and Haagsman 1998) (Dietl and Haller 2005). Para la organización de los lípidos en esta estructura es necesario que existan: a) interacciones mediadas por SP-A entre membranas de surfactante enriquecidas en DPPC; 2) autoasociación de la SP-A dependiente de calcio y 3) fusión de membranas de surfactante mediada por SP-B (Casals and García-Verdugo 2005).

La mielina tubular es una de las fracciones de surfactante con más actividad biofísica, por lo que podría ser un precursor directo de la película interfacial, sirviendo como reservorio de material surfactante. Además, la gran cantidad de SP-A presente tan cerca de la interfase podría desempeñar un papel en la defensa del pulmón frente a patógenos (McCormack and Whitsett 2002) (Casals and García-Verdugo 2005).

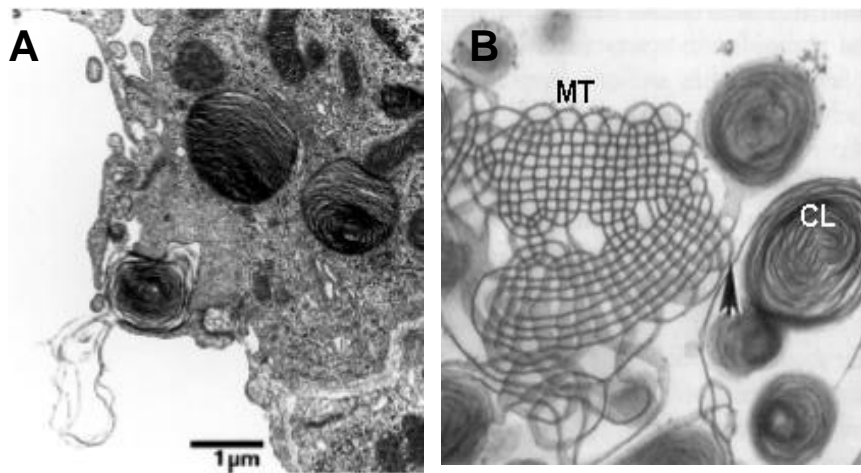


Figura 12: A. Micrografía electrónica de cuerpos lamelares en el proceso de exocitosis en neumocitos tipo II (Rooney 2001). B. Micrografía electrónica de mielina tubular formada a partir de los cuerpos lamelares (Young *et al.* 1992)

2.3. Adsorción interfacial

El material surfactante secretado al fluido alveolar es finalmente adsorbido y transferido a la interfase aire-líquido para formar la monocapa interfacial (Haller *et al.* 2004). Bajo la monocapa interfacial permanecen asociadas múltiples capas de surfactante que actúan como reservorio, facilitando el mantenimiento y reciclaje de la película tensoactiva (Schurch *et al.* 1998) (Figura 13). Con cada espiración se produce la salida de parte del material desde la interfase hacia el reservorio, dando lugar a la aparición de estructuras complejas, mientras que con cada inspiración el material eliminado se reinserta desde el reservorio a la interfase. Este proceso puede realizarse sin pérdidas significativas de material surfactante cuando la SP-C y la SP-B están presentes (Possmayer *et al.* 2001).

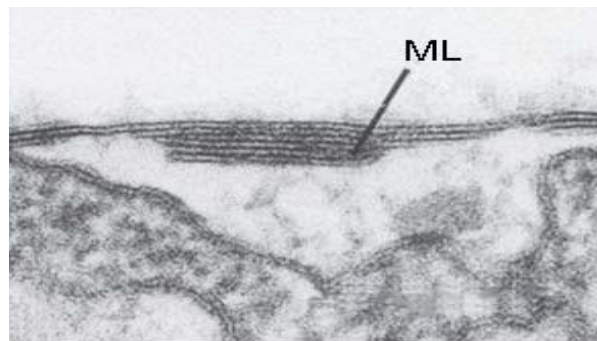


Figura 13: Imagen de microscopía electrónica que muestra la película superficial de surfactante sobre un neumocito. ML: estructuras multilamelares asociadas a la interfase (Schurch *et al.* 1998).

2.4. Degradación y reciclaje

Para prevenir la acumulación de surfactante en el fluido alveolar, el proceso de secreción debe mantenerse en equilibrio con el de eliminación por endocitosis del material estructuralmente alterado u oxidado.

Un 70-80% del surfactante es endocitado por los neumocitos tipo II. La mayor parte se reintegra en la ruta de secreción a nivel de los cuerpos lamelares, donde se combina con surfactante recién sintetizado. En menor proporción, se produce una degradación en los lisosomas hasta generar precursores que serán incorporados en la síntesis de novo. El 20-30% restante es endocitado y degradado por los macrófagos alveolares. La importancia de la participación de los macrófagos alveolares en el ciclo metabólico del surfactante se pone de manifiesto por el hecho de que la deficiencia en el factor GM-CSF (que promueve la maduración de los macrófagos alveolares) o el bloqueo de este

factor mediante anticuerpos altera el catabolismo del surfactante dando lugar a su acumulación en el fluido alveolar, lo que desencadena un estado patológico conocido como proteinosis alveolar (Trapnell and Whitsett 2002) (Trapnell *et al.* 2003).

El surfactante extraído de lavados broncoalveolares puede separarse en dos fracciones de diferente densidad (Lewis *et al.* 1990). La de mayor densidad (agregados grandes, en inglés large aggregates, LA) está enriquecida en complejos multilamelares y/o mielina tubular y en SP-A, SP-B y SP-C. La de menor densidad (agregados pequeños, en inglés small aggregates, SA) está constituida principalmente por vesículas unilamelares y no contiene apenas apolipoproteínas. En presencia de una interfase aire-líquido sometida a ciclos de compresión-expansión, los LA van convirtiéndose progresivamente en SA, lo que sugiere que éstos últimos podrían estar formados por material inactivo que debe ser endocitado por macrófagos alveolares o neumocitos tipo II.

2.5. Regulación

El ciclo metabólico del surfactante se encuentra regulado a distintos niveles:

- Síntesis del surfactante: los glucocorticoides tienen una gran influencia en la síntesis de surfactante. Por un lado, están implicados en la maduración de neumocitos tipo II (Gonzales *et al.* 2002). Además son capaces de estimular la síntesis tanto de los fosfolípidos como de las proteínas del surfactante. Hormonas como las tiroideas, los estrógenos o la prolactina, algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor transformante α (TGF- α) y otros factores que controlen la formación de AMP-cíclico son también capaces de regular la síntesis de distintos componentes del surfactante (Ikegami *et al.* 2005a) (Carroll *et al.* 2002).

- Secreción del surfactante: el mayor estímulo de la secreción de surfactante es la hiperventilación, a través de la expansión mecánica que ésta genera en el epitelio alveolar (Hawgood 1997). No obstante, una inspiración profunda ya es suficiente para desencadenar una secreción masiva de surfactante (Rooney 2001). La secreción de surfactante se produce por la activación de la proteína quinasa A, la proteína quinasa C y/o la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (Andreeva *et al.* 2007), por lo que las moléculas activadoras de dichas proteínas reguladoras actuarán como secretagogos. Entre ellas se encuentran agonistas β -adrenérgicos (Ewing *et al.* 1992),

adenosina, agonistas purinérgicos (Rooney 2001), algunas citoquinas, como TNF- α e IL-2 (Carroll *et al.* 2002), diacilgliceroles, ésteres de forbol (Frick *et al.* 2001), ionóforos de calcio (Hawgood 1997), las lipoproteínas de alta y baja densidad (Pian and Dobbs 1997) o el lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Romero *et al.* 1995). También se ha descrito que algunos componentes del surfactante, como la SP-A y en menor medida también la DPPC, son capaces de regular el metabolismo del surfactante mediante mecanismos de retroalimentación negativa (Dobbs *et al.* 1987). Finalmente, se cree que la SP-D podría verse involucrada en la homeostasis del surfactante pulmonar, ya que ratones *knock-out* para SP-D presentan acumulación de surfactante por un mecanismo aún desconocido (Ikegami *et al.* 2005b).

3. FUNCIONES DEL SURFACTANTE PULMONAR

Las funciones principales de los componentes del surfactante pulmonar son: a) reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido alveolar (factor antiatelectásico); b) defender el pulmón frente a la infección y la inflamación (factor microbicida y antiinflamatorio) y c) mantener la homeostasis del líquido alveolar (factor antiedematoso).

- Reducción de la tensión superficial en la interfase aire-líquido alveolar: La función principal del surfactante pulmonar consiste en mantener la estabilidad alveolar a volúmenes pulmonares bajos (King and Clements 1972) (Van Golde *et al.* 1988). La tensión superficial es la fuerza que tiende a reducir al mínimo el área que ocupa una superficie líquida. En el interior de un líquido las moléculas de agua ejercen y soportan interacciones de magnitud similar en todas las direcciones, mientras que en la interfase las moléculas de agua interaccionan más fuertemente entre ellas que con las moléculas de aire. Esto hace que la superficie del líquido tienda a contraerse al área mínima permitida, haciendo necesaria la aplicación de un trabajo para ensanchar dicha superficie. Idealizando la forma de los alveolos como si fueran cavidades esféricas se puede entender el fenómeno de tensión superficial aplicando la ley de Laplace, según la cual la presión (P) que soporta el alveolo debida a la tensión superficial (γ) es directamente proporcional a ésta e inversamente proporcional al radio del alveolo (r) (Figura 14, A). En ausencia de surfactante, y teniendo en cuenta que el tamaño de los alveolos no es homogéneo, las diferencias de presión entre los más pequeños y los más

grandes ocasionaría el colapso de los más pequeños durante la espiración (Figura 14, B).

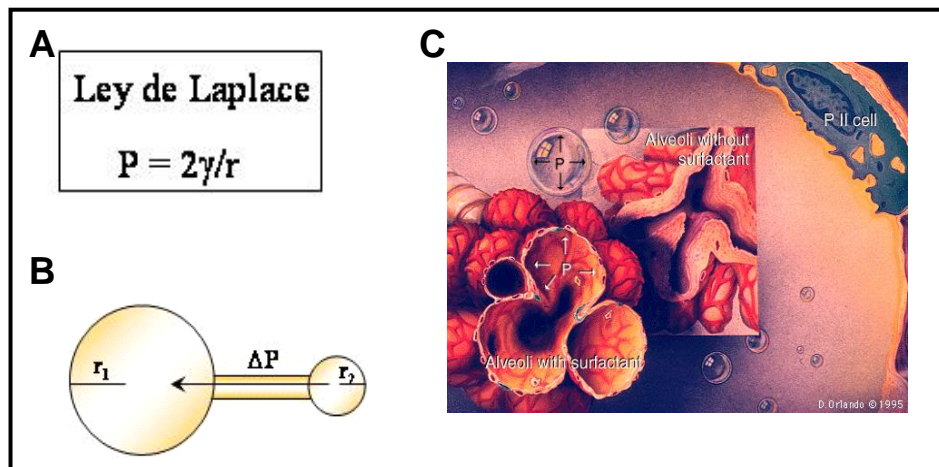


Figura 14: A) Ecuación que define la ley de Laplace; B) La burbuja pequeña tiende a vaciarse en la grande debido a la diferencia de presión entre ambas; C) Estado de un alveolo pulmonar en presencia (situación normal) o ausencia de surfactante pulmonar (situación de colapso).

El surfactante pulmonar tiende a adsorberse y extenderse en la superficie interfacial dado su carácter anfipático, formando una monocapa estable y modulando de esta forma la tensión superficial alveolar. Además, permite que la tensión superficial en la interfase aire líquido disminuya en función del área del alveolo (Zuo and Possmayer 2007). A menor área habrá una menor tensión superficial debido a la compactación de moléculas de DPPC en la interfase aire líquido que excluyen moléculas de agua (Figura 14, C). Experimentalmente se observa que la presencia de una monocapa de moléculas de DPPC desplaza un cierto número de moléculas de agua de la interfase, y esto produce una reducción de la tensión superficial desde unos 70 mN/m (tensión superficial del agua pura a 37 °C) hasta valores cercanos a 0 mN/m durante la compresión de la monocapa.

- Contribución en la defensa inmune innata del pulmón frente a patógenos: El epitelio alveolar constituye la mayor superficie de contacto del organismo con su entorno, lo que supone una potencial vía de entrada para patógenos, alérgenos y contaminantes. El surfactante pulmonar es la primera barrera defensiva con la que se encuentran dichas sustancias, ya que dificulta la adhesión de éstas al epitelio alveolar. Por otra parte, y principalmente mediado por SP-A y SP-D, el surfactante facilita la eliminación de

patógenos de forma directa, mediante la actividad bactericida, o indirecta, facilitando la fagocitosis por macrófagos alveolares o neutrófilos (Wright 2005). Además, las colectinas pulmonares actúan como modulador de la actividad inflamatoria de las células del sistema inmune (linfocitos, macrófagos alveolares y neutrófilos), manteniendo un balance entre las actividades inmunoactivadoras en inmunopresoras, fundamental para mantener un equilibrio adecuado de la respuesta inmune.

- Mantenimiento de la homeostasis del líquido alveolar, previniendo así la formación de un edema pulmonar. Éste se define como la acumulación anormal de líquido en el intersticio, y por tanto también en el espacio alveolar. Las fuerzas que gobiernan la salida o entrada de líquido de los capilares al intersticio se rigen por la ecuación de Starling:

$$Q = K_f([P_c - P_i] - R[\pi_c - \pi_i])$$

donde **Q**: es el flujo de líquido desde los capilares al intersticio; **K_f** es el coeficiente de filtración, que expresa la permeabilidad de la pared capilar para los líquidos; **P_c** es la presión hidrostática capilar; **P_i** es la presión hidrostática intersticial; **R** es el coeficiente de reflexión, que expresa la eficacia de la pared capilar para impedir el paso de proteínas (en condiciones normales R es igual a 1, totalmente impermeable a las mismas, y en situaciones patológicas, inferior a 1, siendo el valor 0 cuando es totalmente permeable); **π_c** es la presión oncótica capilar; **π_i** es la presión oncótica intersticial (Tabla 1) (Figura 15).

	mm Hg
Presión hidrostática capilar	+7
Presión hidrostática intersticial	- 8
Presión oncótica capilar	+28
Presión oncótica intersticial	+14

Tabla 1: Fuerzas que gobiernan la entrada y salida de líquidos entre capilares e intersticio.

En condiciones normales las presiones hidrostáticas y oncóticas hacen que haya un pequeño flujo de líquido del plasma al intersticio (presión media neta de líquido de los capilares al intersticio de +1). La gran mayoría de éste es eliminado por el sistema linfático, manteniéndose así un bajo nivel de fluido en los espacios alveolares. Cuando

alguna de las fuerzas implicadas se ve alterada este flujo puede revertirse (Ganter *et al.* 2006). El surfactante pulmonar reduce la tensión superficial de manera proporcional a la reducción del área de los alveolos durante la espiración, manteniendo constante la presión intraalveolar y por tanto también la presión hidrostática del líquido intersticial. Cuando el surfactante pulmonar se encuentra dañado se produce una disminución en la presión hidrostática intersticial, de forma que el gradiente hidrostático no es compensado por el oncótico, lo que trae como consecuencia la extravasación de líquido de los capilares al intersticio y de ahí al alveolo, generándose un edema pulmonar. Además de líquido también hay infiltración de proteínas plasmáticas y mediadores inflamatorios que pueden inactivar al surfactante, lo que puede generar en última instancia un fallo respiratorio agudo. (Matthay *et al.* 2005) (Nag *et al.* 2007) (Spragg *et al.* 2003) (Zasadzinski *et al.* 2005).

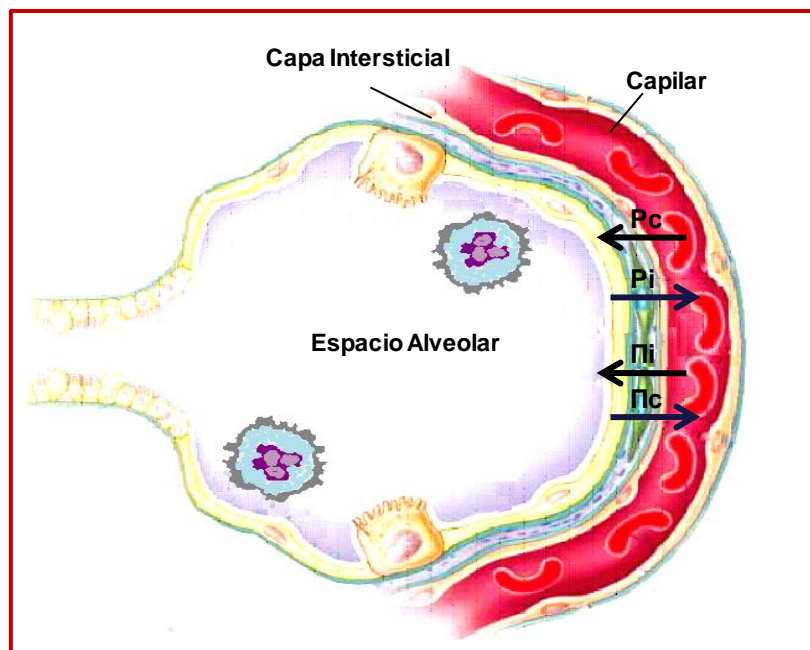


Figura 15: Esquema de las fuerzas que gobiernan la salida o entrada de los capilares al intersticio. Pc: presión hidrostática capilar; Pi: presión hidrostática intersticial; Π c: presión oncótica capilar; Π i: presión oncótica intersticial.

3.1. Funciones específicas de los lípidos

La función del surfactante pulmonar de reducir la tensión superficial en la interfase aire líquido para evitar el colapso alveolar recae fundamentalmente en el componente lipídico, ya que su carácter anfipático permite que los fosfolípidos se dispongan en

forma de monocapa en la interfase, con las cabezas polares dispuestas hacia la zona acuosa y las colas apolares hacia la zona aérea. Debido a esta situación, se produce una exclusión de moléculas de agua de la monocapa, de tal manera que los fosfolípidos adsorbidos reducen la tensión superficial del líquido en la interfase aire-líquido desde unos 70 mN/m (tensión superficial correspondiente al agua) hasta aproximadamente 25 mN/m durante la fase de equilibrio, llegándose hasta valores próximos a 0 mN/m durante la compresión (Schurch 1982). Numerosos estudios han demostrado que sólo las moléculas con una alta cantidad de fosfolípidos saturados, fundamentalmente DPPC, presentan capacidad para reducir la tensión superficial hasta esos valores (Goerke 1998). Las membranas de DPPC presentan una temperatura de transición de fase gel-líquido cristalino de 41°C, temperatura ligeramente superior que la temperatura fisiológica, por lo que a 37°C el material surfactante tendrá regiones en fase gel enriquecidas en DPPC con una estructura altamente ordenada capaz de soportar el empaquetamiento que se produce con el aumento en la presión superficial durante las fases de compresión (Hawco *et al.* 1981).

La temperatura de transición de fase de la DPPC hace que su adsorción a la interfase sea muy lenta, por lo que es importante la presencia de otras especies lipídicas con temperaturas de transición de fase inferiores (como los fosfolípidos insaturados) para fluidificar las membranas ricas en DPPC y favorecer su adsorción (Hook *et al.* 1984). Esta mezcla de fosfolípidos saturados e insaturados produce una separación lateral de fase y una coexistencia de dominios sólidos y fluidos en un amplio rango de temperaturas, que incluyen la temperatura fisiológica. De esta forma las membranas son lo suficientemente fluidas para adsorberse eficientemente en la interfase pero también pueden empaquetarse durante la fase de compresión, enriqueciendo la monocapa en DPPC. Este proceso podría realizarse de dos formas: Por un lado, podría darse una inserción selectiva de DPPC a la interfase (Schurch *et al.* 1998). Por otro, podría producirse una eliminación de la interfase del resto de fosfolípidos que no sean DPPC, en un proceso conocido como “squeeze out”. De esta forma, durante la fase de expansión la DPPC se adsorbería rápidamente a la interfase gracias a la presencia de fosfolípidos insaturados, que serían selectivamente excluidos de la monocapa durante las fases de compresión (Diemel *et al.* 2002), formando estructuras multilamelares asociadas a la interfase en forma de reservorio (Schurch *et al.* 1998) (Figura 16). No

obstante, hay datos recientes que demuestran que la composición del surfactante no varía durante la compresión de la monocapa, obteniéndose durante la fase de colapso una mezcla de dominios de PL insaturados y DPPC (Zuo *et al.* 2008).

La presencia de colesterol modifica la estructura lateral de las membranas de surfactante, debido a que cuando se inserta entre lípidos en fase gel incrementa la separación entre los fosfolípidos y fluidifica estas estructuras ordenadas, y cuando se asocia con lípidos en fase fluida tiene un efecto condensante, incrementando el empaquetamiento de esta estructura (Presti *et al.* 1982) (Sankaram and Thompson 1991). Parece que pequeñas cantidades de colesterol son necesarias para el mantenimiento de una separación lateral de fases fluido ordenado/fluido desordenado necesaria para la funcionalidad del surfactante (Bernardino de la Serna *et al.* 2004).

Parece que los lípidos podrían tener un papel en la defensa inmune innata debido a su capacidad inmunosupresora, ya que son capaces de inhibir la producción de citoquinas, inmunoglobulinas y otros mediadores implicados en el proceso inflamatorio (Wright 1997). También se ha sugerido que los lípidos del surfactante podrían ejercer un efecto paliativo en casos de daño pulmonar, al provocar la apoptosis de fibroblastos y disminuir la acumulación de colágeno (Vazquez de Lara *et al.* 2000).

3.2. Funciones específicas de las proteínas

3.2.1. SP-A

Muchas de las funciones que desempeña la SP-A han podido estudiarse gracias a la utilización de ratones modificados genéticamente, que sobreexpresan SP-A (Elhalwagi *et al.* 1999) o que son deficientes en ella (Korfhagen *et al.* 1996) (Ikegami *et al.* 1998)

Las múltiples funciones descritas hasta el momento para la SP-A se derivan de su capacidad para interaccionar con múltiples ligandos (McCormack 1998), entre los que se encuentran moléculas anfipáticas lipídicas presentes en membranas de surfactante o de microorganismos, azúcares de glicolípidos y glicoproteínas, así como diversas proteínas presentes en membranas de patógenos y receptores de superficies celulares.

Funciones relacionadas con el surfactante pulmonar:

- Formación de la mielina tubular: la SP-A se localiza en las esquinas del entramado de mielina tubular (Palaniyar *et al.* 1999) y se ha demostrado que es esencial para su formación y estabilidad (Poulain *et al.* 1992). Estos datos se corroboran con el hecho de que pacientes con síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS) presentan un déficit tanto de SP-A como de mielina tubular (deMello *et al.* 1993), y que ratones con alteraciones en los genes de la SP-A tienen poca o ninguna mielina tubular (Korfhagen *et al.* 1996) (Ikegami *et al.* 1998). Para el proceso de formación de la mielina tubular también es necesaria la presencia de SP-B y calcio (Suzuki *et al.* 1989).
- Regulación de la adsorción interfacial de fosfolípidos en la interfase aire-líquido: aunque la SP-A no es capaz por sí sola de promover la adsorción de fosfolípidos, se ha comprobado que sí la incrementa, favoreciendo la formación de la monocapa interfacial (Yu and Possmayer 1998) y mejorando la tensión superficial del surfactante en colaboración con la SP-B (Efrati *et al.* 1987). En relación con esta propiedad está el hecho de que la SP-A favorece la inserción selectiva de DPPC en la monocapa interfacial (Veldhuizen and Haagsman 2000) (Figura 16).
- Mantenimiento de los agregados grandes, que constituyen la fracción funcionalmente activa del surfactante pulmonar en el alveolo (Veldhuizen *et al.* 1996).
- Modulación de la secreción y recaptura de fosfolípidos: la SP-A participa en la regulación del ciclo metabólico del surfactante pulmonar de dos formas. Por un lado, favorece la recaptura de surfactante a través de la unión específica a receptores de neumocitos tipo II para su reciclaje (Wright *et al.* 1987) y macrófagos alveolares para su degradación (Quintero *et al.* 2002). Por otro lado, inhibe la secreción de surfactante por parte de los neumocitos tipo II mediante un mecanismo regulador de retroalimentación negativa (Dobbs *et al.* 1987), que parece darse por la activación de la PI 3' quinasa tras la unión de la SP-A a su receptor específico (White and Strayer 2000).
- Protección contra la inactivación de surfactante: las proteínas provenientes del suero invaden el espacio alveolar en las patologías respiratorias que cursan con edema, interfiriendo con el surfactante pulmonar e inactivándolo. Se ha demostrado que la SP-A, a determinadas concentraciones, es capaz de bloquear la acción de estas proteínas

tanto *in vitro* (Cockshutt *et al.* 1990) como *in vivo* (Yukitake *et al.* 1995). Además, se ha demostrado que la SP-A protege al surfactante de la inhibición por meconio (Sun *et al.* 1997)

- Regulación de la expresión génica de proteínas del surfactante: Se ha descrito que la SP-A puede jugar un papel en la regulación de la expresión génica para la propia SP-A, SP-B y SP-C (Korutla and Strayer 1999).

Funciones relacionadas con la defensa inmune innata en el alveolo

Ratones *knock out* para el gen de la SP-A presentan una mayor susceptibilidad a la acción de organismos patógenos que ratones normales (LeVine *et al.* 1997) (Hickman-Davis *et al.* 1999) (Linke *et al.* 2001). Cuando a estos ratones se les suplementa con SP-A, la infección se reduce (LeVine *et al.* 1999).

- Interacción con células del entorno alveolar: la SP-A es capaz de interaccionar con varios tipos de células del sistema inmune presentes en el entorno alveolar, como macrófagos alveolares, neutrófilos y linfocitos. La unión puede realizarse a través de diferentes receptores presentes en la membrana de las células y a través de diferentes regiones de la SP-A. Esta unión afecta a varias respuestas celulares, como la quimiotaxis, la fagocitosis, la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, la liberación de citoquinas y enzimas proteolíticas, la proliferación linfocitaria, o la expresión de receptores de superficie implicados en el reconocimiento de microorganismos, como el receptor de manosa (Casals and Garcia-Verdugo 2005) (Wright 2005). La SP-A actúa como un modulador de la respuesta inflamatoria, presentando una actividad pro o antiinflamatoria dependiendo de la situación presente en el alveolo. Así, puede tener una actividad proinflamatoria induciendo la producción de radicales libres o de citoquinas para facilitar la eliminación de patógenos, o antiinflamatoria, disminuyendo la producción de estos mediadores para evitar el daño pulmonar (Casals and Garcia-Verdugo 2005).

- Interacción con microorganismos patógenos: la SP-A es capaz de interaccionar a través de su dominio C-terminal con carbohidratos presentes en la superficie de superficies bacterianas, virales y fúngicas, así como con el LPS rugoso de la pared de bacterias Gram negativas (Casals and Garcia-Verdugo 2005) (Wright 2005). A través

de esta unión es capaz de neutralizar, aglutinar e incrementar la fagocitosis de estos microorganismos por parte de macrófagos alveolares y neutrófilos (Madan *et al.* 1997). Con respecto a los virus, se ha descrito que la SP-A contribuye a la fagocitosis del virus herpes simplex de tipo I (van Iwaarden *et al.* 1991), el virus respiratorio sincitial (Griese 2002) y el virus de la influenza A (Benne *et al.* 1997). Con respecto a las bacterias, la SP-A interacciona con una gran cantidad de bacterias, facilitando su captura por parte de células fagocíticas. Estudios en modelos murinos de infección utilizando ratones que carecen de SP-A indican que los ratones deficientes en la proteína son más susceptibles a infecciones bacterianas (LeVine *et al.* 1997). Con respecto a los hongos, sus infecciones en el pulmón en condiciones normales son raras, a pesar de que algunos, como *Aspergillus fumigatus*, se encuentran comúnmente en el ambiente y son continuamente inhalados. Parece que las colectinas pulmonares podrían estar implicadas en la protección inmediata con infecciones de hongos en el pulmón (Madan *et al.* 1997).

3.2.2. SP-D

Ratones *knock out* para el gen de la SP-D presentan una acumulación de surfactante en los espacios alveolares y una hipertrofia de los neumocitos tipo II, lo que sugiere que la SP-D podría desempeñar un papel importante en la homeostasis del surfactante (McCormack and Whitsett 2002) (Wright 2005). Además, estos animales tienen una mayor susceptibilidad a infecciones respiratorias y otras disfunciones relacionadas con la defensa inmune innata (Hawgood and Poulain 2001).

Como en el caso de la SP-A, las propiedades funcionales de la SP-D derivan de su capacidad de interacción con distintos ligandos o receptores celulares.

- Interacción con células del entorno alveolar: la SP-D es capaz de interaccionar con células del entorno alveolar a través de receptores, estimulando la fagocitosis, liberando especies reactivas de oxígeno y actuando como agente quimiotáctico, todo lo cual conduce a la eliminación de organismos patógenos (Crouch *et al.* 2000). Por otra parte, también es capaz de modular la respuesta inflamatoria y alérgica (Lawson and Reid 2000).

- Interacción con microorganismos patógenos: la SP-D se une a carbohidratos presentes en la superficie de bacterias, lo que produce la aglutinación de éstos favoreciendo su eliminación por las vías respiratorias superiores mediante el transporte mucociliar, así como su opsonización (Crouch 2000) (Lawson and Reid 2000). Además, es capaz de actuar frente a hongos, levaduras, virus y micoplasmas (Lawson and Reid 2000).

3.2.3. SP-B

Se trata de una proteína indispensable para la vida, ya que niños incapaces de producir SP-B madura se ven afectados por graves insuficiencias que les conducen a la muerte (Nogee *et al.* 1993), y ratones *knock out* para la SP-B sufren graves afecciones respiratorias que resultan letales (Tokieda *et al.* 1997). La deficiencia de SP-B provoca alteraciones celulares en el pulmón, proteinosis alveolar, ausencia de cuerpos lamelares y mielina tubular, niveles alterados de fosfatidilglicerol y disminución de la actividad interfacial (deMello *et al.* 1994). Además, los pulmones carentes de SP-B poseen unos niveles anormalmente bajos de SP-C madura, acumulándose el precursor en los espacios alveolares, lo que sugiere una implicación indirecta de SP-B en el procesamiento de SP-C (Vorbroke *et al.* 1995).

La SP-B es una proteína estrechamente unida a lípidos, lo que ha de influir en sus funciones:

- Implicación en el ciclo metabólico del surfactante: la SP-B es fundamental para el empaquetamiento del surfactante en los cuerpos lamelares y, junto con la SP-A, para la formación de la mielina tubular (Weaver and Conkright 2001). También promueve la recaptura de fosfolípidos del surfactante por los neumocitos tipo II (Horowitz *et al.* 1996). Por otra parte, la SP-B es necesaria para una rápida adsorción de los fosfolípidos a la interfase aire-líquido. (Veldhuizen and Haagsman 2000).

- Modulación de las propiedades tensoactivas de la monocapa lipídica: la SP-B favorece el enriquecimiento en DPPC durante la compresión (Brockman *et al.* 2003) y facilita la expansión de la película tensoactiva durante la inspiración (Taneva and Keough 1994). Se ha sugerido que el dímero de SP-B podría hacer de puente entre dos bicapas o entre una bicapa y una monocapa, situando las caras hidrofóbicas de cada monómero en contacto con cada una de las membranas (Johansson and Curstedt 1997) (Weaver 1998)

(Figura 16). Esto explicaría fenómenos promovidos por la proteína, como la agregación y la fusión de vesículas lipídicas, la inducción de intercambio de fosfolípidos entre vesículas, la pérdida de contenidos acuosos (Poulain *et al.* 1996), o la formación de un reservorio de material tensoactivo bajo la película interfacial que facilitaría la reexpansión de la monocapa tras la espiración (Alig *et al.* 2004).

3.2.4. SP-C

Al contrario de lo que ocurría con la SP-B, la ausencia de SP-C no provoca alteraciones ni en el surfactante ni en la funcionalidad pulmonar (Glasser *et al.* 2000), aunque sí se ha encontrado una relación entre mutaciones en la SP-C y el desarrollo de enfermedades pulmonares intersticiales (Nogee *et al.* 2002). Estas mutaciones se han identificado tanto en la secuencia de la proteína madura como en el dominio C-terminal de su precursor, donde conducen a plegamientos incorrectos de la proteína y a interrupciones de su tráfico intracelular. Estas acumulaciones intracelulares de SP-C se han relacionado con patologías como la deficiencia de α -1-antitripsina o la fibrosis quística (Riordan 1999).

Al igual que ocurría con la SP-B, la funcionalidad de la proteína viene determinada por su unión a lípidos.

- Implicación en el ciclo metabólico del surfactante: la SP-C parece estar implicada en la recaptura de los fosfolípidos por parte de los neumocitos tipo II (Horowitz *et al.* 1996). Por otra parte, la SP-C promueve la adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido (Oosterlaken-Dijksterhuis *et al.* 1991)

- Modulación de las propiedades tensoactivas de la monocapa lipídica: la SP-C favorece el enriquecimiento de la monocapa en DPPC ya que, durante la compresión, la proteína resulta excluida de la monocapa y va acompañada de 8 a 10 moléculas de PC (Perez-Gil and Keough 1998). De esta manera, la SP-C promueve la formación de estructuras multilamelares asociadas a la interfase durante la compresión, que actuarían como reservorios de material tensoactivo, desde donde se reinsertarían en la etapa de expansión (Figura 16). Los ácidos palmíticos presentes en la estructura de la proteína parecen esenciales para esta dinámica, ya que las cadenas de acilo se situarían en una

monocapa o bicapa diferente a la de la parte α -helicoidal hidrofóbica (Gustafsson *et al.* 2000).

- Defensa inmune innata en el alveolo: estudios recientes demuestran que la SP-C parece jugar un importante papel en la defensa inmune innata del pulmón frente a patógenos, ya que ratones deficientes en SP-C presentan una mayor susceptibilidad a la infección por *Pseudomonas aeruginosa* (Glasser *et al.* 2008) o el virus respiratorio sincitial (Glasser *et al.* 2009).

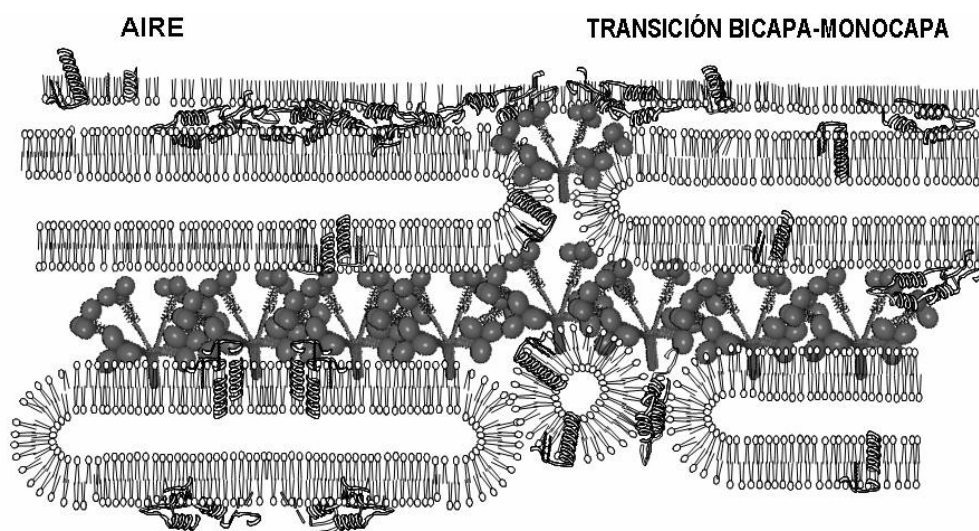


Figura 16: Modelo de la interacción de las proteínas del surfactante con la monocapa interfacial y con las bicapas asociadas.

4. SURFACTANTE PULMONAR Y PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS

El surfactante pulmonar se encuentra alterado en diversas patologías respiratorias (Frerking *et al.* 2001), entre las que se encuentran enfermedades obstructivas como asma, bronquiolitis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica; fibrosis quística; neumonías; aspiración de meconio; y proteinosis alveolar.

4.1. Síndrome de distrés respiratorio agudo

El término síndrome de distrés respiratorio agudo (en inglés, ARDS) hace referencia a las etapas finales y más severas del daño pulmonar agudo (en inglés, ALI). Durante años hubo una gran controversia acerca de las definiciones exactas para estos dos

términos, hasta que en 1994 la Conferencia Consenso Americana-Europea estableció las definiciones que han venido utilizándose a partir de entonces (Bernard *et al.* 1994): Ambos estados patológicos se caracterizan por un daño inflamatorio de carácter agudo y persistente, con aumento de la permeabilidad vascular, presencia de infiltrados bilaterales y edema pulmonar. La diferencia entre el ALI y el ARDS radica en que el primero presenta un ratio presión parcial de O₂ / fracción de O₂ inspirado (PaO₂/FiO₂) de 201-300 mm Hg, mientras que el segundo es de carácter más grave, presentando un ratio ≤ 200 mm Hg.

Las causas etiológicas del ARDS son diversas ya que el pulmón está expuesto al flujo sanguíneo total y en permanente contacto con el medio externo. Así, hay una gran variabilidad de factores que afectan al pulmón, ya sea de una manera indirecta (inhalaación de gases tóxicos, aspiración de flujo gástrico, infecciones bacterianas, etc.) o indirecta (traumatismo, shock de cualquier etiología, sobredosis de drogas, quemaduras, etc.) y que inducen una disfunción pulmonar grave.

Independientemente del tipo de agente que desencadena el ARDS se produce una lesión en la barrera alveolo-capilar que da lugar a un incremento de la permeabilidad de las membranas epitelial y endotelial. En consecuencia, se produce la entrada masiva de líquido al intersticio y espacios aéreos del pulmón, generándose un edema pulmonar de origen no cardiogénico. El surfactante pulmonar resulta inactivado tanto por proteínas del plasma como por la acción de especies reactivas de oxígeno y la síntesis de sus componentes disminuida por citoquinas proinflamatorias sobre los neumocitos tipo II (Zuo *et al.* 2008). La inhibición de la actividad biofísica del surfactante agrava el cuadro ya que da lugar a atelectasis o colapso alveolar. Los alveolos están perfundidos pero no ventilados por lo que se origina una hipoxemia refractaria al oxígeno (Piantadosi and Schwartz 2004).

4.2. Daño por isquemia-reperfusión tras el transplante de pulmón

El transplante de pulmón es el último recurso terapéutico para pacientes con determinadas enfermedades respiratorias, tales como fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o hipertensión pulmonar primaria, para las que no existe ningún tratamiento alternativo (Woo 2008).

Aproximadamente un 10-25% de los receptores de un trasplante de pulmón sufren, en el transcurso de las 72 horas posteriores, la denominada disfunción primaria del injerto (Lee and Christie 2009), siendo ésta la primera causa de mortalidad inmediata tras el trasplante.

Los pacientes presentan un cuadro semejante a ARDS, caracterizado por hipoxemia progresiva, disminución de la distensibilidad pulmonar y edema producido por un aumento de la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar. La Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón ha establecido varios grados de gravedad en función del ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (Christie *et al.* 2005a).

Esta disfunción primaria del injerto parece estar causada por el daño por isquemia-reperfusión que se produce en el pulmón transplantado (Zenati *et al.* 1990) (van der Kaaij *et al.* 2008). El daño por isquemia-reperfusión compromete la funcionalidad pulmonar tanto en estadios tempranos produciendo rechazo agudo (Christie *et al.* 2005b) como tardíos, con enfermedades crónicas asociadas, como la bronquiolitis obliterante (Daud *et al.* 2007).

Las técnicas de preservación han mejorado mucho en los últimos años, siendo actualmente la práctica habitual un mantenimiento en hipotermia del pulmón inflado al 100% de oxígeno y perfundido de forma anterógrada y retrógrada con una solución de preservación durante el menor tiempo posible (no más de 8 horas) (Hicks *et al.* 2006) (Woo 2008). No obstante, la preservación en hipotermia supone la aparición de una serie de alteraciones bioquímicas e histológicas que serán más graves cuanto mayor sea el tiempo de preservación (de Perrot *et al.* 2003a). Entre ellas se encuentran: aumento del estrés oxidativo; inactivación de la bomba de sodio con la consecuente acumulación de sodio intracelular y pérdida de potasio intracelular; aumento de calcio intracelular, que actuará como mediador inflamatorio en diversas cascadas; liberación de hierro; muerte celular por necrosis y apoptosis; y liberación de citoquinas.

En modelos animales, el daño por isquemia-reperfusión ha demostrado ser bifásico (Eppinger *et al.* 1995). La primera fase se caracteriza por la activación de los macrófagos alveolares que residen en el pulmón del donante, durante el periodo de isquemia y después del proceso de trasplante durante la perfusión. Estudios

realizados en un modelo de isquemia-reperfusión en pulmón de rata indican que una depleción de éstos disminuye la permeabilidad vascular, la acumulación de neutrófilos en el tejido y la producción de mediadores inflamatorios (Naidu *et al.* 2003). Asimismo, se ha demostrado que la secreción de TNF- α en esta fase temprana se produce de forma exclusiva por los macrófagos alveolares (Naidu *et al.* 2004). Recientemente se ha demostrado que los productos secretados por los macrófagos alveolares activados disparan la respuesta inflamatoria de células endoteliales (McCourtie *et al.* 2008a) y neumocitos tipo II (Sharma *et al.* 2007) (McCourtie *et al.* 2008b), que además sufren un aumento significativo de apoptosis (Van Putte *et al.* 2005). Todos estos tipos celulares producen especies reactivas de oxígeno, quimiocinas y citoquinas que son las responsables de la instauración de la fase tardía, caracterizada por el reclutamiento de neutrófilos procedentes del torrente sanguíneo del receptor, por su adhesión al endotelio y por la activación de distintas cascadas inflamatorias (Eppinger *et al.* 1997) (Wagner and Roth 2000) que conducen a una perpetuación del daño. A pesar de que los linfocitos T son uno de los mediadores más importantes de la respuesta inmune adaptativa, poco se sabe acerca de su papel en el daño por isquemia-reperfusión, aunque hay estudios que demuestran su intervención en el desarrollo de la patogénesis (de Perrot *et al.* 2003b) (Geudens *et al.* 2007), y se sugiere que podrían desempeñar un papel protector en las etapas de recuperación (Linfert *et al.* 2009).

Todo este estatus inflamatorio produce un daño significativo en el endotelio pulmonar y en el epitelio alveolar y, por tanto, en los neumocitos tipo II, responsables de la producción y secreción del surfactante pulmonar (Fehrenbach 2001). La alteración en la biosíntesis y secreción del surfactante contribuye a la patogénesis del daño por isquemia-reperfusión (Casals *et al.* 1998) (Valino *et al.* 2004).

Las alteraciones del surfactante pulmonar pueden ocurrir en distintos niveles del proceso del trasplante pulmonar:

- En el donante: el surfactante pulmonar del donante que va a ser transplantado podría estar alterado por contaminación con proteínas del plasma en el caso de muerte cerebral, ya que ésta origina edema pulmonar debido a fenómenos hidrostáticos (Malik 1985). La resistencia vascular pulmonar disminuye y simultáneamente aumenta el flujo sanguíneo de la arteria pulmonar (Bittner *et al.* 1995). En donantes previamente sometidos a

ventilación mecánica, especialmente cuando se usan volúmenes tidales grandes o presiones positivas al final de la espiración (PEEP) muy bajas, el surfactante puede estar parcialmente alterado, siendo esta alteración previa a la que se produce en la funcionalidad pulmonar (Maruscak *et al.* 2008).

- Durante el proceso de preservación: se ha visto que tras dos horas de preservación en caliente de un pulmón y en ausencia de solución de preservación, el surfactante comienza a contaminarse con fosfolípidos de las membranas celulares como consecuencia de la muerte celular. Sin embargo, cuando se usan líquidos de preservación adecuados y se mantiene inflado el pulmón, los neumocitos tipo II conservan la capacidad secretora de surfactante (Akashi *et al.* 1993) aunque si la preservación se realiza por debajo de los 13°C, la secreción de surfactante se bloquea. Una buena preservación no produce alteraciones en el sistema del surfactante (Casals *et al.* 1998).

- En el periodo posttransplante, una vez iniciada la reperfusión: El surfactante pulmonar se usa como marcador del daño por isquemia-reperfusión. Diversos estudios han identificado la alteración del sistema surfactante y los mecanismos por los que esto ocurre (Casals *et al.* 1998) (Hohlfeld *et al.* 1998) (Valino *et al.* 2004) (Veldhuizen *et al.* 1993) (Erasmus *et al.* 1994). Entre estas alteraciones se encuentran:

- Disminución en la proporción de la fracción activa del surfactante respecto de la fracción inactiva (Veldhuizen *et al.* 1993) (Hohlfeld *et al.* 1998) (Valino *et al.* 2004).

- Disminución en los niveles de SP-A (Casals *et al.* 1998) (Veldhuizen *et al.* 1993) mientras que los de SP-B y SP-C parecen no encontrarse alterados (Valino *et al.* 2004)

- Inhibición de la actividad biofísica del surfactante (Veldhuizen *et al.* 1993) (Erasmus *et al.* 1994) (Hohlfeld *et al.* 1998) (Casals *et al.* 1998), debido, entre otras cosas, a la inactivación por proteínas plasmáticas que se extravasan desde el torrente sanguíneo al espacio alveolar. Se ha visto por ejemplo, que los niveles de la proteína C reactiva (CRP) incrementan en el lavado broncoalveolar de pulmones transplantados y que la CRP se asocia al surfactante pulmonar (Casals *et al.* 1998). Los mecanismos por los cuales la CRP inhibe la actividad biofísica del surfactante pulmonar se han descrito recientemente (Saenz *et al.* 2010).

Junto a las alteraciones del surfactante se produce también un deterioro de la funcionalidad pulmonar, manifestado a través de diversos parámetros (Casals *et al.* 1998) (Hohlfeld *et al.* 1998) (Veldhuizen *et al.* 1993), como son una reducción de la relación PO_2/FiO_2 arterial, un aumento de la tensión de CO_2 (PCO_2), un descenso del volumen de espiración forzada, una reducción de la distensibilidad pulmonar o un incremento de células inflamatorias en el fluido alveolar, con el daño que eso conlleva.

4.2.1. Estrategias para prevenir o tratar el daño por isquemia-reperfusión

Actualmente en clínica el abordaje principal para prevenir el daño por isquemia-reperfusión consiste en limitar lo más posible el tiempo de isquemia, limitando el tiempo de preservación a un máximo de 8 horas. Hay investigaciones recientes acerca de cómo el preconditionamiento isquémico, basado en un periodo de isquemia breve que serviría de adaptación a una isquemia prolongada, podría mejorar el daño posterior (Tapuria *et al.* 2008). Experimentos en animales demostraron efectos beneficiosos tras la adición de prostaglandina E1 en el líquido de preservación (Chiang *et al.* 1999) o tras una perfusión gradual de más de 10 minutos (Pierre *et al.* 1998a), por lo que algunos centros usan ambos abordajes como estrategias de prevención.

Estudios en modelos animales demuestran que la administración de surfactante exógeno previamente a la perfusión podría minimizar los daños asociados al daño por isquemia-reperfusión (Hohlfeld *et al.* 1999) (Koletsis *et al.* 2003) (Dreyer *et al.* 2008) (van Putte *et al.* 2009) (van der Kaaij *et al.* 2009) y un estudio clínico basado en la administración de surfactante exógeno en el pulmón donante previamente a la extracción del órgano demostró una mejora en la funcionalidad del surfactante así como una reducción del edema (Struber *et al.* 2007). Otras estrategias experimentales que se han ensayado son la inhibición del complemento (Pierre *et al.* 1998b), el uso de antagonistas del factor activador de plaquetas (Wittwer *et al.* 2001) o el uso del fármaco tacrolimus (Krishnadasan *et al.* 2002) (Woolley *et al.* 2004).

5. TACROLIMUS

Una gran cantidad de fármacos presentes en biomedicina proceden de metabolitos producidos por cepas microbianas. La ciclosporina A es un metabolito del hongo *Tolypocladium inflatum* que fue descubierto en primer lugar como antifúngico pero más tarde se demostró su papel como potente inmunosupresor. A partir de este hallazgo comenzaron a realizarse una gran cantidad de estudios para encontrar sustancias que tuvieran efectos similares.

En 1984 se descubrió una molécula con un potente efecto inmunosupresor procedente de una cepa de *Streptomyces*. Se descubrió en Tsukuba, Japón, por lo que recibió el nombre de *Streptomyces tsukubaensis* (Figura 17). El producto se llamó tacrolimus (Tsukuba macrolide immunosuppressant) o FK506 (número de catálogo de Fermentek 506). Esta cepa bacteriana alcanza la fase de crecimiento estacionaria tras una fermentación de 40 horas. La producción del tacrolimus comienza a las 40 horas y la máxima acumulación se observa a las 90 horas de fermentación. El producto fue purificado a partir de extracciones estándar y columnas de cromatografía (Kino and Goto 1993). Actualmente su síntesis es orgánica.

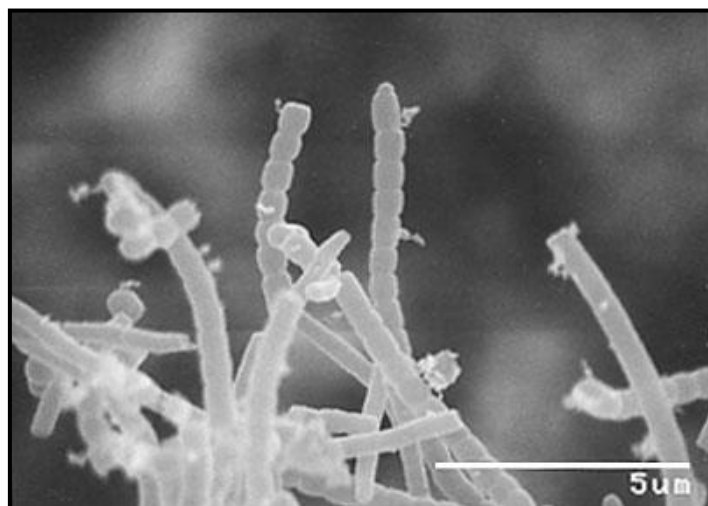


Figura 17: Microscopía electrónica de la cepa productora de FK506, *S. tsukubaensis*.

5.1. Características estructurales del tacrolimus

Estructuralmente, el tacrolimus está incluido dentro del grupo de los macrólidos, concretamente dentro de las lactonas macrocíclicas. Posee una α, β , dicetoamida funcionalmente incorporada a un anillo de 23 miembros (Figura 18).

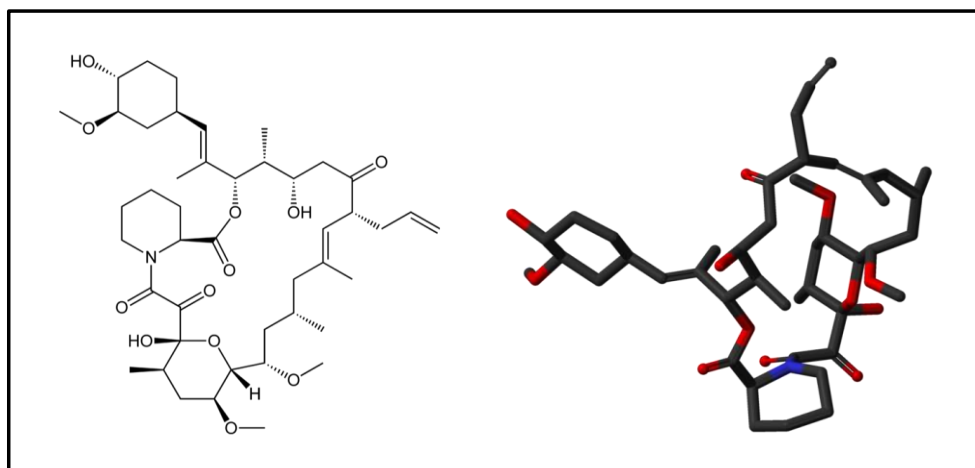


Figura 18: Estructura química (izquierda) y modelo tridimensional (derecha) del tacrolimus

Se trata de un fármaco altamente lipofílico, soluble en metanol y otros disolventes orgánicos de baja constante dieléctrica. Es prácticamente insoluble en agua y tiene un peso molecular de 822 Da.

5.2. Mecanismo de acción del tacrolimus

En términos de farmacodinámica, el tacrolimus es considerado como un inhibidor de la calcineurina. El tacrolimus se une con alta afinidad a proteínas perteneciente a la familia de las inmunofilinas, denominadas **FK-binding proteins (FKBP)** (Kang *et al.* 2008). Estas proteínas se encuentran en el citoplasma tanto de células del sistema inmune como de células no inmunes, como las neuronas (Dawson *et al.* 1994). Se trata de unas proteínas que presentan actividad peptidil prolil *cis-trans* isomerasa (PPIasa) (Harding *et al.* 1989) por lo que intervienen en el plegamiento de otras proteínas. Además, pueden presentar actividad chaperona (Monaghan and Bell 2005), pero parece que ambas actividades son independientes.

Cuando el tacrolimus penetra en una célula a través de su membrana celular, por difusión, inmediatamente se une a FKBP-12, que está asociada al lado citosólico de la membrana plasmática. Esta proteína posee un único dominio de 108 aminoácidos que es el sitio de unión al tacrolimus. La FKBP-12 humana interacciona con el tacrolimus con una constante de disociación, K_d , de 0.4 nM (Gothel and Marahiel 1999) y la unión de FKBP-12 a tacrolimus aumenta la estabilidad de la proteína, la hace más resistente a la proteólisis y crea una superficie adecuada de unión a calcineurina (Galat 2003).

En ausencia del tacrolimus, FKBP-12 está unida a distintos sustratos celulares, entre otros el receptor de rianodina (Brillantes *et al.* 1994), interviniendo en la regulación de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico; el receptor del 1,4,5-inositoltrifosfato (IP_3R), modulando posiblemente el estado de fosforilación del receptor al interactuar con la calcineurina (Cameron *et al.* 1995); o el receptor I del factor de crecimiento transformante- β ($\text{TGF-}\beta\text{RI}$), probablemente por el mismo sitio de unión que tacrolimus (Wang *et al.* 1994). Todos estos datos sugieren que FKBP-12 está implicada en interacciones proteína-proteína así como en procesos de regulación de su actividad.

El tacrolimus inhibe la actividad PPIasa de FKBP-12, pero el complejo tacrolimus-FKBP-12 ejerce un potente efecto inmunosupresor en linfocitos T (Schreiber 1991) por su unión a la calcineurina, lo que conlleva una inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina (Fruman *et al.* 1992) (Figuras 19-21).

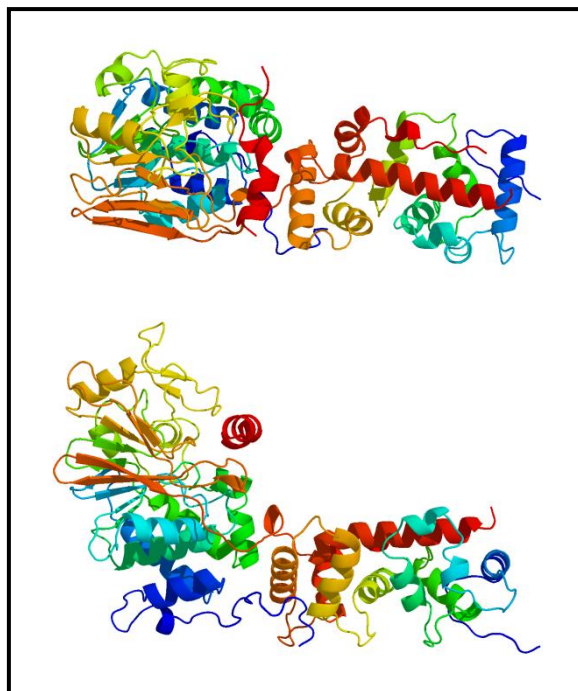


Figura 19: Estructura cristalográfica de la calcineurina humana (superior) y el complejo formado por FKBP-12, FK506 y calcineurina humanas (inferior) (Kissinger *et al.* 1995)

La **calcineurina** es una proteína perteneciente a la familia de las proteínas fosfatasa 2B, con actividad serina-treonina fosfatasa, dependiente de calcio-calmodulina. Es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad A catalítica de 60 kDa y una subunidad B reguladora de 19 kDa que está miristoilada. Además del dominio

catalítico, la subunidad A contiene un dominio C-terminal autoinhibitorio y dominios de unión a la calmodulina y a la subunidad B, que es la región de unión a calcio (Hemenway and Heitman 1999) (Figura 20).

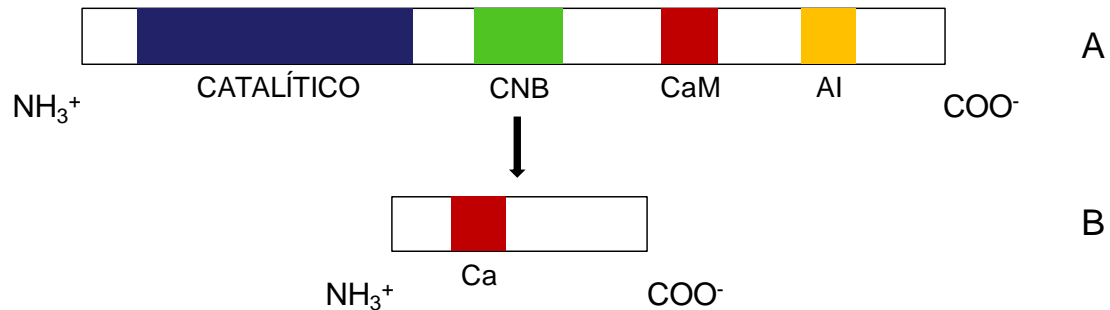


Figura 20: Esquema de la estructura de la calcineurina. A: subunidad A catalítica que contiene el dominio catalítico, el dominio de unión a la subunidad B reguladora (CNB), el dominio de unión a la calmodulina (CaM) y un dominio autoinhibitorio (AI). B: subunidad B reguladora que contiene el dominio de unión a calcio (Ca).

La calcineurina está ampliamente distribuida en el organismo, desempeñando una gran cantidad de funciones (Rusnak and Mertz 2000). Una de las más destacadas es la de participar en la cascada de señalización que conduce a la activación de los linfocitos T (Clipstone and Crabtree 1992), y es aquí donde radica el principal mecanismo de acción de tacrolimus, que actúa inhibiendo la síntesis de IL-2 en linfocitos T-helper estimulados (Plosker and Foster 2000) (Figura 21).

Cuando los receptores de los linfocitos T se estimulan, la fosfolipasa C libera inositol trifosfato de la membrana plasmática. El inositol trifosfato se une a su receptor en el retículo endoplásmico, lo que provoca una salida masiva de calcio al citoplasma. El aumento del Ca^{2+} citoplásmico provoca la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática, lo que se traduce en un aumento aún mayor del Ca^{2+} intracelular (Feske *et al.* 2003). La calcineurina en condiciones normales se encuentra plegada de tal forma que su dominio autoinhibitorio bloquea el acceso al sitio activo. La unión de Ca^{2+} -calmodulina provoca la inactivación del dominio autoinhibitorio, liberando al dominio catalítico, que puede de esta forma ejercer su actividad fosfatasa (Halloran *et al.* 1998). Uno de los sustratos de la calcineurina es el factor nuclear de linfocitos T activados (NF-AT), que se encuentra fosforilado y por tanto inactivo en el citoplasma. La desfosforilación producida por la calcineurina produce la activación de este factor de

transcripción y su migración inmediata al núcleo, donde por unión al DNA activa la síntesis de la IL-2, interferón gamma y otras citoquinas (Timmerman *et al.* 1996).

El tacrolimus, debido a su fuerte hidrofobicidad, atraviesa la membrana plasmática por difusión pasiva, sin necesidad de unirse a ningún receptor (Bultynck *et al.* 2002). Allí se une a FKBP-12 y el complejo FK506/FKBP-12, pero no cada uno de sus componentes por separado, se une a la calcineurina entre las unidades A y B impidiendo la liberación del sitio catalítico. La actividad de la calcineurina queda por tanto bloqueada, impidiéndose así la desfosforilación de NF-AT y su migración al núcleo, y evitando por tanto la síntesis y secreción de IL-2 y otras citoquinas.

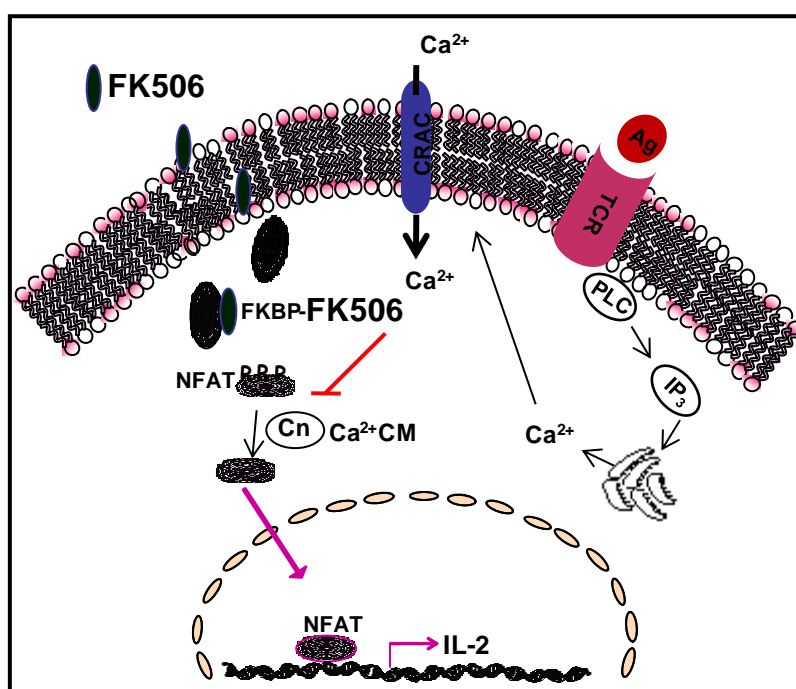


Figura 21: Esquema del mecanismo de acción del tacrolimus en linfocitos T. Cuando los receptores de los linfocitos T (TCR) se estimulan, la fosfolipasa C (PLC) libera inositol trifosfato (IP_3) que libera calcio (Ca^{2+}) del retículo endoplásmico. Este aumento del Ca^{2+} citoplásmico provoca la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática (CRAC), lo que se traduce en un aumento aún mayor del Ca^{2+} intracelular. Éste se une a la calmodulina (CM) y el complejo Ca^{2+} -CM se une a la calcineurina (Cn). Uno de los sustratos de la calcineurina es el factor nuclear de linfocitos T activados (NF-AT), que se encuentra fosforilado y por tanto inactivo en el citoplasma. La desfosforilación producida por la calcineurina produce su activación y migración inmediata al núcleo, donde por unión al DNA activa la síntesis de la IL-2. El complejo tacrolimus-FKBP se une a la calcineurina lo que bloquea la desfosforilación de NF-AT y su migración al núcleo, y evitando por tanto la síntesis de IL-2.

La calcineurina también activa factores de transcripción de otros genes de citoquinas (IL-3, IL-4, IL-5, TNF- α), interferón- γ , GMSF, y receptores de IL-2 y IL-7 (Gummert *et al.* 1999). Además es capaz de activar otros factores de transcripción como NF- κ B (Mattila *et al.* 1990) y AP-1, AP-2 y Oct-1 (Emmel *et al.* 1989).

5.3. Usos terapéuticos del tacrolimus

Actualmente el tacrolimus se usa en clínica como fármaco de elección para la prevención y tratamiento del rechazo en los trasplantes de corazón, hígado y riñón y hay numerosos estudios que demuestran su efectividad en trasplantes de pulmón, páncreas y médula ósea (Scott *et al.* 2003). También se usa habitualmente para el tratamiento de la dermatitis atópica, sobre todo en sus fases crónicas (El-Batawy *et al.* 2009) y hay estudios que demuestran su efectividad en otras enfermedades de la piel como dermatitis de contacto, dermatitis seborreica, psoriasis, rosácea o vitíligo (Wollina 2007). Hay estudios recientes que demuestran que el tacrolimus podría resultar beneficioso para el tratamiento de otras patologías, tales como enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa (Chow and Leong 2007) (Baumgart *et al.* 2008); el síndrome nefrótico idiopático (Westhoff and van der Giet 2007); o la artritis reumatoide (Kitahara and Kawai 2007).

La **forma de administración** más común es por vía oral, aunque si el paciente lo requiere, también puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular y, en el tratamiento de las enfermedades de la piel, de forma tópica. A pesar de su efecto beneficioso como inmunosupresor, la administración sistémica del tacrolimus produce una serie de **efectos secundarios**, entre éstos podemos encontrar (Reichenspurner 2005): fallo renal, problemas cardiovasculares, alteración en el metabolismo de la glucosa, infecciones y malignidad, desórdenes neurológicos, hipertensión, hiperlipidemia, problemas gastrointestinales, hirsutismo o anemia.

Estos efectos secundarios se deben principalmente a la gran variabilidad en los **parámetros farmacocinéticos** que presenta el tacrolimus (Tabla 2), principalmente su biodisponibilidad que oscila entre un 4 y un 93%. Esto le confiere un índice terapéutico muy estrecho, que hace necesario un ajuste individual de dosis mediante una monitorización de las concentraciones del fármaco en sangre a través de ensayos de ELISA, MEIA o EMIT (Yano 2008). Así, la concentración mínima del fármaco debe

encontrarse dentro del intervalo terapéutico, pero ni inferior a este intervalo, ya que no se alcanzaría el efecto inmunosupresor, ni superior, ya que se producirían los efectos secundarios descritos asociados a la toxicidad sistémica. La limitación principal de esta monitorización radica en que sólo puede realizarse una vez el fármaco es administrado, por lo que no puede usarse para predecir la dosis inicial.

PARÁMETRO	[intervalo]
t_{\max} (h)	[0.5-6]
C_{\max} (ng/ml)	[0.1-0.8]
Biodisponibilidad (%)	[4-93]
V_d (l/kg)	[0.5-1.4]
Aclaramiento (l/h/kg)	[0.03-0.09]
$t_{1/2}$ eliminación (h)	[4-41]

Tabla 2: Tabla modificada de (Scott *et al.* 2003) donde se resumen algunos de los parámetros farmacocinéticos del tacrolimus en receptores de un trasplante a partir de los datos de (Venkataramanan *et al.* 1995), realizados tras la administración oral de 0.30 mg/kg/día de tacrolimus. t_{\max} : tiempo que tarda el fármaco en alcanzar la C_{\max} ; C_{\max} : concentración máxima del fármaco; V_d : volumen de distribución; $t_{1/2}$: vida media.

Uno de los factores responsables de la gran variabilidad en los parámetros farmacocinéticos del tacrolimus es el hecho de que el tacrolimus es sustrato de la **P-glicoproteína** (Saeki *et al.* 1993). La P-glicoproteína es una proteína transportadora de la familia de las ATP-binding cassette, codificada en humanos por el gen MDR1. Está presente en la membrana plasmática de diversos tipos celulares, tanto en tejidos normales (como las células epiteliales del tracto gastrointestinal, hígado y riñón, en los capilares de cerebro, testículos y ovarios (Ambudkar *et al.* 2003), y en macrófagos (Combates *et al.* 1997) (Hartkoorn *et al.* 2007)) como en células tumorales, donde es un indicador de malignidad, ya que hace posible la resistencia de la célula tumoral a fármacos antineoplásicos (Germann 1996).

La P-glicoproteína actúa como una barrera en la captura de xenobióticos por parte de las células, disminuyendo así su concentración intracelular y, en consecuencia, disminuyendo su efecto. Una de las estrategias que se plantean para evitar la acción de expulsión de la P-glicoproteína es la de vehiculizar los fármacos en inmunoliposomas,

ya que parece que de esta forma podrían entrar al citoplasma mediante endocitosis mediada por receptor (Huwyler *et al.* 2002).

Estructuralmente, la P-glicoproteína es una proteína integral de membrana de entre 170-180 kDa, compuesta por dos mitades homólogas. Cada mitad contiene 6 segmentos transmembrana y un dominio de unión a ATP y ambas mitades se encuentran unidas por una región de unión flexible (Figura 22). Parece que los dominios con mayor afinidad de unión a fármacos son los dominios transmembrana 4, 5, 6 y 10, 11, 12 (Ambudkar *et al.* 1999). Se encuentra glicosilada en tres sitios, N91, N94 y N99, localizados en el primer bucle extracelular. La glicosilación es una señal de direccionamiento que dirige la proteína recién sintetizada a la membrana plasmática de la célula, pero no es esencial para su función transportadora de moléculas hidrofóbicas o anfipáticas a través de la membrana (Gribar *et al.* 2000). Recientemente se ha resuelto la estructura de la P-glicoproteína de ratón por rayos X (Aller *et al.* 2009) (Figura 23).

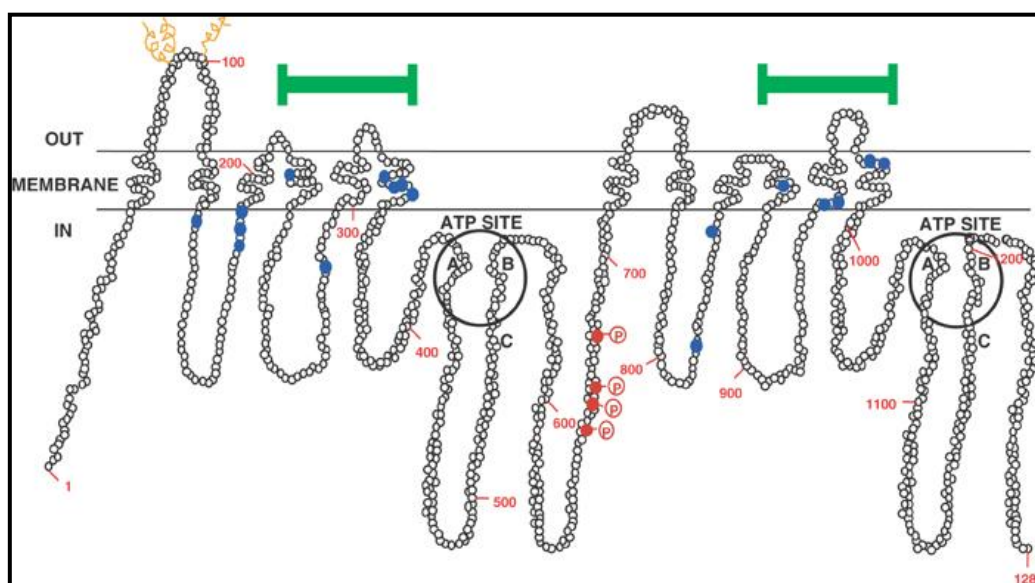


Figura 22: Modelo hipotético de la estructura bidimensional de la P-glicoproteína humana extraído de (Ambudkar *et al.* 2003). Cada círculo representa uno de los aminoácidos que componen la proteína. Los dos sitios de unión de ATP están rodeados por un círculo. Las barras verdes indican los dominios transmembrana que poseen mayor especificidad de unión a fármacos (4, 5, 6 y 10, 11, 12). Los círculos azules indican las posiciones de algunas de las mutaciones que alteran la especificidad de sustrato de la P-glicoproteína. Los círculos rojos señalan los sitios de fosforilación localizados en la región de unión (S661, S667, S671, S683). Los sitios de glicosilación están señalados con hélices naranjas (N91, N94, N99).

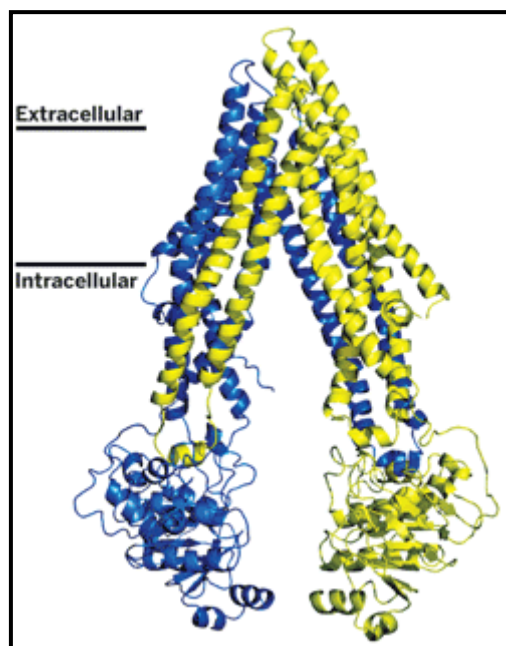


Figura 23: Estructura de la P-glicoproteína de ratón resuelta por rayos X extraída de (Aller *et al.* 2009).

El mecanismo de acción de la P-glicoproteína no se conoce. Se sabe que para la correcta funcionalidad de la proteína es imprescindible la conexión entre ambas mitades así como una comunicación entre los sitios de unión al sustrato y los sitios de unión/hidrólisis de ATP (Sauna *et al.* 2001). El esquema propuesto por (Ambudkar *et al.* 2003) establece un ciclo catalítico con distintas etapas. En primer lugar, el fármaco y el ATP se unen a sus respectivos sitios de unión. La hidrólisis de ATP produce una disminución de la afinidad del fármaco y del ADP por la proteína con la consecuente liberación de ambos. La liberación del ADP viene acompañada de un cambio conformacional que permite la unión de una segunda molécula de ATP, aunque la afinidad por el fármaco sigue siendo reducida. La hidrólisis del ATP y liberación del ADP produce un nuevo cambio conformacional que aumenta la afinidad del fármaco por la proteína, completándose de esta forma el ciclo catalítico. En este modelo la hidrólisis de ATP tendría dos papeles. Por un lado, aportaría la energía necesaria para el transporte del sustrato y por otro sería necesaria para que se produzcan los cambios conformacionales necesarios para que dé comienzo el siguiente ciclo catalítico.

El tacrolimus se **absorbe** rápidamente en el tracto gastrointestinal, aunque de forma incompleta, debido a la presencia de la P-glicoproteína en las células epiteliales que

tapizan esta región. Una vez en sangre, es **transportado** mayoritariamente por los eritrocitos, aunque también se encuentra unido a proteínas plasmáticas como la albúmina o la glicoproteína α_1 ácida (Christians *et al.* 2002). Estudios animales demuestran que se **distribuye** por la mayoría de los tejidos, incluyendo pulmones, bazo, corazón, riñón, páncreas, cerebro, músculo e hígado (Plosker and Foster 2000).

Con respecto al **metabolismo**, el tacrolimus se metaboliza en el retículo endoplásmico de células hepáticas e intestinales por el citocromo p450 3A4. Se han identificado 8 metabolitos de tacrolimus, tres monodimetilados, tres dimetilados, uno monohidroxilado y uno modificado por múltiples reacciones (Iwasaki 2007). La mayor parte de los metabolitos se expulsan por las heces, vía secreción biliar, y muy poco por la orina. No se han encontrado niveles significativos de la molécula sin metabolizar en heces o en orina, lo que indica que tacrolimus se metaboliza casi por completo antes de la eliminación.

Para poder desarrollar una administración personalizada es necesario poder hacer una predicción de la farmacocinética y metabolismo que tendrá el fármaco en un paciente concreto, y en este sentido la investigación está centrada en el campo de la farmacogenómica, fundamentalmente a través del estudio molecular de la P-glicoproteína y el citocromo p450 3A4 (Masuda and Inui 2006) (de Jonge and Kuypers 2008).

5.4. Uso del tacrolimus en transplante de pulmón

Los fármacos inmunosupresores han permitido a lo largo de los años mejorar la supervivencia y reducir los efectos secundarios tras el transplante de pulmón. Los protocolos de terapia inmunosupresora consisten en la administración del fármaco inmunosupresor antes o inmediatamente después del transplante y a lo largo de toda la vida del paciente. Los fármacos de elección suelen ser la ciclosporina, la azatioprina y los corticosteroides, aunque algunos centros han sustituido la azatioprina por el mofetil micofenolato y la ciclosporina por el tacrolimus. Los resultados encontrados en un metaanálisis reciente parecen indicar que el tacrolimus y la ciclosporina tendrían el mismo efecto en cuanto a supervivencia a largo plazo (de un año en adelante), aunque el tacrolimus tendría un efecto mayor a la hora de evitar el rechazo agudo (Fan *et al.* 2009).

El pulmón es un excelente portal de entrada de fármacos. En transplante de pulmón, la administración intratraqueal de fármacos inmunosupresores podría lograr una concentración alta del fármaco en el pulmón y disminuiría los efectos tóxicos sistémicos, ya que la concentración total de fármaco a administrar podría reducirse considerablemente. Recientemente se ha investigado sobre el efecto beneficioso de la administración de la ciclosporina nebulizada, conjuntamente con inmunosupresión sistémica, como terapia de mantenimiento para evitar el rechazo en un transplante pulmonar (Iacono *et al.* 2006). Los resultados indican un efecto beneficioso en cuanto a supervivencia a largo plazo con respecto a los pacientes que únicamente recibieron la inmunosupresión sistémica. No obstante, esta forma de administración produjo como efecto negativo una importante irritación en las vías respiratorias superiores, debido a que el vehículo con el que se administra la ciclosporina (fármaco hidrofóbico) es el propilenglicol. Estudios realizados en modelos de transplante de pulmón en rata demuestran que el tacrolimus, administrado con inhaladores presurizados (Ingu *et al.* 2005) (Ide *et al.* 2007) o con nebulizadores con el fármaco disuelto en etanol (Schrepfer *et al.* 2007), tiene menos efectos secundarios que la administración sistémica, siendo sus efectos inmunosupresores igual de efectivos a la hora de controlar el rechazo. Recientemente se han desarrollado preparaciones de nanopartículas de tacrolimus producidas mediante un proceso de congelación ultrarápida para ser administradas por nebulización (Sinswat *et al.* 2008). Esta técnica produce agregados nanoestructurados con una gran superficie de contacto, lo que resulta en una velocidad de disolución del fármaco mucho mayor. Mediante esta forma de administración, el fármaco alcanzaría de forma rápida el espacio alveolar, pudiendo interaccionar con los diferentes componentes, tanto celulares como humorales presentes en el fluido alveolar como la SP-A que es la proteína mayoritaria del fluido. Nuestro grupo ha demostrado que SP-A interacciona con un derivado dansilado de tacrolimus con una constante de asociación, K_a , de $(1 \pm 0.5) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Canadas *et al.* 2005), lo que indica que la SP-A podría influir en la biodisponibilidad del fármaco en los espacios alveolares, afectando a su absorción y funcionalidad. También se han realizado liposomas de tacrolimus con fosfatidilcolina hidrogenada y colesterol para ser administradas con inhaladores de polvo seco (Chougule *et al.* 2007), y nuestro grupo ha desarrollado una preparación de tacrolimus vehiculizado en vesículas de fosfolípidos específicos del surfactante pulmonar (DPPC y POPG), lo que podría beneficiar la llegada del fármaco a los espacios alveolares

mediante instilación sin alterar la composición del surfactante (Canadas *et al.* 2004). Esta formulación de tacrolimus liposomal mantiene las propiedades inmunosupresoras del fármaco.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis ha sido estudiar las propiedades inmunomoduladoras de tacrolimus liposomal y tacrolimus libre y su interacción con componentes del fluido alveolar para su administración por vía inhalatoria en trasplante de pulmón y otras patologías respiratorias que cursan con una respuesta inflamatoria exacerbada.

El tacrolimus es un fármaco de carácter liposoluble con un poderoso efecto supresor de la proliferación y producción de IL-2 en linfocitos T. Su potencial efecto antiinflamatorio en macrófagos no ha sido, sin embargo, estudiado en profundidad. Debido a su carácter inmunosupresor se utiliza en el tratamiento y prevención del rechazo del injerto en trasplante de órganos. En el caso del trasplante de pulmón, la administración de este fármaco por vía intratraqueal (instilación o nebulización) minimizaría sus efectos adversos nefrotóxicos y hepatotóxicos ya que la dosis necesaria sería menor que la requerida vía oral o intravenosa.

En los últimos años se ha trabajado activamente en formulaciones de tacrolimus adecuadas para su administración intratraqueal:

- a) Formación de partículas de tacrolimus producidas a partir de una rápida criogenización para ser administradas por nebulización (Watts *et al.* 2010) (Sinswat *et al.* 2008).
- b) Encapsulación de tacrolimus en liposomas para ser administrados por instilación o nebulización (Canadas *et al.* 2004) (Chougule *et al.* 2007).

En el caso de partículas de tacrolimus generadas por criogenización, el tamaño aerodinámico de las partículas es de 3-4 μm y se ha demostrado que se depositan adecuadamente en los pulmones mediante nebulización. Sin embargo, se desconoce la interacción de estas partículas con los componentes del fluido alveolar, lo que podría afectar a las propiedades del fármaco y/o absorción por las células alveolares. En concreto no se conoce el efecto de su interacción con la SP-A (Canadas *et al.* 2005) proteína mayoritaria del fluido alveolar, sobre las propiedades inmunomoduladoras del fármaco.

Respecto a la vehiculización de tacrolimus en liposomas, la mayor parte de los estudios se han realizado utilizando liposomas para administración tópica en enfermedades autoinmunes de piel (Erdogan *et al.* 2002) o retina (Zhang *et al.* 2010), o bien para

administración intravenosa en transplante de hígado (Ko *et al.* 1995) o corazón (Moffatt *et al.* 1999). Sin embargo, los liposomas dirigidos hacia el espacio alveolar del pulmón requieren una composición lipídica especial, que no perturbe ni afecte a las membranas del surfactante que cubren el epitelio alveolar, y que son esenciales para la mecánica respiratoria. En este sentido, nuestro grupo ha desarrollado nanoliposomas de tacrolimus constuidos por fosfolípidos característicos del surfactante pulmonar (DPPC y POPG) y 1 % molar de tacrolimus encapsulado en el seno de las membranas. El diámetro hidrodinámico medio de estas vesículas unilamelares es de 120-150 nm, lo que permite fácilmente su esterilización. El tacrolimus liposomal retiene su actividad inmunosupresora sobre linfocitos T (Canadas *et al.* 2004) pero se desconoce sus efectos sobre macrófagos, células que están activamente implicadas en el proceso inflamatorio que caracteriza el daño por isquemia-reperfusión tras el trasplante pulmonar. Tampoco se han descrito aún los posibles efectos beneficiosos que esta u otra preparación de tacrolimus liposomal tendría *in vivo* en un modelo de trasplante de pulmón.

Por lo que **los objetivos concretos** de la tesis han sido:

A partir de tacrolimus liposomal:

1. **Analizar si el tacrolimus liposomal tiene actividad antiinflamatoria sobre macrófagos en comparación con tacrolimus libre.** (*Capítulo 1*).
2. **Evaluar el potencial efecto beneficioso de la administración intratraqueal de tacrolimus liposomal para paliar el daño por isquemia-reperfusión tras el trasplante de pulmón.** (*Capítulo 2*).

A partir de tacrolimus libre:

3. **Caracterizar la unión de tacrolimus a la proteína mayoritaria del fluido alveolar, SP-A, y estudiar el efecto de dicha unión sobre las propiedades inmunosupresoras del fármaco en linfocitos T y sobre la estructura, propiedades y funciones de la proteína.** (*Capítulo 3*).
4. **Evaluar la actividad antiinflamatoria de los complejos tacrolimus-SP-A sobre macrófagos.** (*Capítulo 4*).

CAPÍTULO 1

Efecto antiinflamatorio de tacrolimus encapsulado en nanoliposomas de composición similar a las membranas de surfactante pulmonar

1. RESUMEN

Tacrolimus es un agente inmunosupresor de carácter hidrofóbico. La utilidad clínica de las formulaciones orales o parenterales se ve dificultada por las grandes variaciones en eficacia y toxicidad en función de la dosis. La administración directa al pulmón de nanoliposomas que contienen tacrolimus es una aproximación muy prometedora para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Nuestro grupo ha desarrollado una nueva formulación liposomal de tacrolimus en vesículas de fosfolípidos característicos del surfactante pulmonar (DPPC y POPG) para ser administrado intratraquealmente y se ha demostrado que mantiene la capacidad inmunosupresora del fármaco en linfocitos T. El estudio llevado a cabo en esta tesis tiene como objetivo determinar el efecto antiinflamatorio de esta preparación liposomal de tacrolimus en comparación con tacrolimus libre en macrófagos estimulados por LPS, ya que la activación incontrolada de macrófagos alveolares dispara el daño por isquemia reperfusión tras el transplante pulmonar. Los resultados indican que son necesarias concentraciones de tacrolimus libre $\geq 10 \mu\text{M}$ para observar efectos antiinflamatorios en distintas líneas celulares de macrófagos de ratón (alveolares y peritoneales) y humano (U937) estimulados con LPS. En contraste, tacrolimus liposomal inhibió significativamente la secreción de $\text{TNF-}\alpha$ inducida por LPS a partir de concentraciones de 0.001 nM sin presentar efectos secundarios de citotoxicidad. Tacrolimus libre ($0.001 \text{ nM} - 1 \mu\text{M}$), pero no tacrolimus liposomal, es sustrato de la proteína transportadora P-glicoproteína, lo cual incrementa la dosis requerida para ejercer el efecto antiinflamatorio en macrófagos. A diferencia del tacrolimus libre, el tacrolimus liposomal se internaliza en la célula mediante un mecanismo de endocitosis y el uso de distintos inhibidores de endocitosis bloquea la inhibición inducida por tacrolimus liposomal de la secreción de $\text{TNF-}\alpha$ por macrófagos estimulados por LPS. Estos resultados indican que la incorporación de tacrolimus en nanoliposomas incrementa su capacidad antiinflamatoria sobre macrófagos en varios órdenes de magnitud. El vehículo liposomal facilita la entrada del fármaco en la célula por un mecanismo endocítico que evita su expulsión por la P-glicoproteína.

2. INTRODUCCIÓN

El tacrolimus es un fármaco de carácter altamente liposoluble cuyo principal mecanismo de acción consiste en el bloqueo de la proliferación y secreción de IL-2 en linfocitos T mediante inhibición de la actividad de la calcineurina (Fruman *et al.* 1992) (Plosker and Foster 2000). A pesar de que su principal uso terapéutico es el de

inmunosupresor para la prevención y tratamiento del rechazo de distintos órganos (Scott *et al.* 2003), también se ha demostrado su utilidad en el tratamiento de varias enfermedades inflamatorias como la dermatitis atópica (El-Batawy *et al.* 2009), enfermedades inflamatorias intestinales (Chow and Leong 2007) o el daño por isquemia reperusión (St Peter *et al.* 2003a).

Uno de los problemas del uso del tacrolimus es la enorme fluctuación en la biodisponibilidad del fármaco (que oscila entre un 4 y un 93 %) (Scott *et al.* 2003) que implica un intervalo terapéutico estrecho con grandes variaciones en su eficacia y toxicidad dependiendo de la dosis. Cuando el fármaco se administra vía oral estas diferencias en la biodisponibilidad se deben, al menos en parte, a la presencia de la proteína de multirresistencia a drogas P-glicoproteína en la membrana plasmática de las células epiteliales del tracto gastrointestinal, proteína de la que el tacrolimus es sustrato (Saeki *et al.* 1993).

Una de las aproximaciones clínicas de administración de tacrolimus es el uso de nanoliposomas. Se ha estudiado el efecto de la administración intravenosa de tacrolimus liposomal en modelos animales de trasplante de hígado (Ko *et al.* 1995), corazón (Moffatt *et al.* 1999) o islotes (Yang *et al.* 2002), donde se ha demostrado que la encapsulación del tacrolimus en vesículas de fosfolípidos incrementaba el efecto inmunosupresor del fármaco. Además se han realizado estudios de la administración local de liposomas de tacrolimus. Éstos han resultado ser efectivos en modelos animales de daño tales como enfermedades inmunes de la piel al ser administrados por vía tópica (Erdogan *et al.* 2002), daño cerebral al ser administrados directamente al cerebro (Alemdar *et al.* 2004) o uveoretinitis autoinmune al ser administrados por inyección intravítrea (Zhang *et al.* 2010). Dado que el pulmón es un órgano favorable para ello, la administración directa de liposomas de tacrolimus podría resultar efectiva en el tratamiento de patologías respiratorias. Recientemente se ha desarrollado una preparación de nanoliposomas de tacrolimus para ser administrada directamente al pulmón por el sistema de inhalación de polvo seco (Chougule *et al.* 2007). Se trata de liposomas de tacrolimus preparados con una mezcla de fosfatidilcolina hidrogenada y colesterol (8:2) con un tamaño final de 10 μm que permanecen en el fluido alveolar durante al menos 24 horas. La composición lipídica de estos liposomas y su alta permanencia en el espacio alveolar debido a su gran tamaño podría ser perjudicial para

el surfactante pulmonar. Hay estudios que demuestran que la función del surfactante pulmonar se ve afectada por una elevada proporción de colesterol (Gunasekara *et al.* 2005). El estudio carece de datos de funcionalidad del fármaco en un modelo de daño, por lo que esta preparación podría no resultar efectiva.

Nuestro grupo ha desarrollado una preparación liposomal de tacrolimus en vesículas de fosfolípidos similares a los del surfactante pulmonar (Canadas *et al.* 2004). Estas vesículas están formadas por el tacrolimus y una mezcla de DPPC y POPG (8:2) con un tamaño aproximado de 40-100 nm. Los análisis realizados en un modelo celular de proliferación de linfocitos T demostraron que el tacrolimus, localizado en el *core* hidrofóbico de las vesículas, mantenía sus propiedades inmunosupresoras (Canadas *et al.* 2004).

Dado que los macrófagos activados de manera exacerbada juegan un papel fundamental en las enfermedades inflamatorias, entre ellas en el daño por isquemia reperusión producido tras un trasplante pulmonar (Krishnadasan *et al.* 2002), el objetivo de este capítulo consiste en analizar el potencial efecto antiinflamatorio de esta preparación liposomal de tacrolimus en macrófagos estimulados con LPS.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Condiciones de cultivo

Todos los experimentos con cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad. Los modelos celulares utilizados para estudiar la capacidad antiinflamatoria del tacrolimus fueron las U937, las MH-S y las RAW 264.7. Las U937 son una línea promonocítica humana procedente de un linfoma histiocítico difuso (Sundstrom and Nilsson 1976) (Figura 1). En presencia de ciertos agentes como el forbol-miristatoacetato (PMA) esta línea celular es capaz de diferenciarse a macrófagos inmaduros y manifestar ciertas características típicas de éstos, tales como la presencia en la membrana plasmática del receptor de unión a LPS, CD14 (Taimi *et al.* 1994), o la secreción de citoquinas proinflamatorias, entre ellas el TNF- α (Hass *et al.* 1991). Las MH-S son una línea de macrófagos alveolares de ratón (Mbawuike and Herscowitz 1989) (Figura 2). Las RAW 264.7 son una línea de macrófagos peritoneales de ratón (Raschke *et al.* 1978) (Figura 3).

Número ATCC: **CRL-1593.2**

Designación: **U-937**

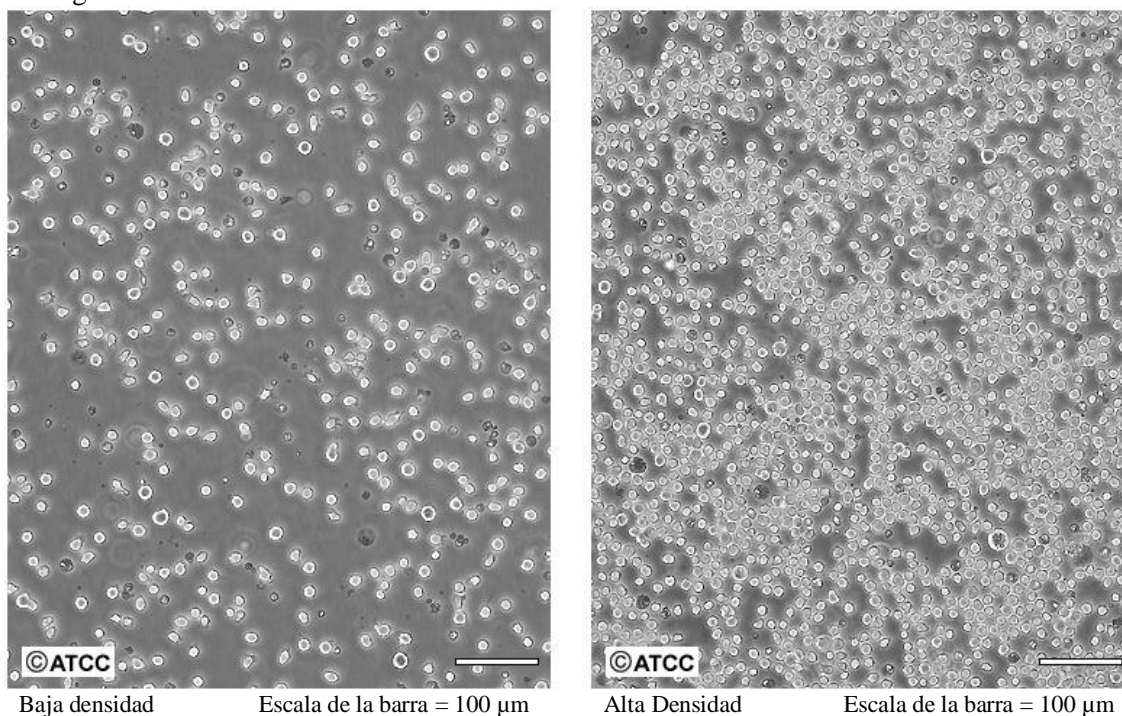


Figura 1: Morfología de las células U937 por microscopía óptica

Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con HEPES y Glutamina (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ) con suero bovino fetal (FBS) al 10 % v/v (descomplementado a 56 °C durante 30 minutos) (BioWhitaker, Walkersville, MD) y antibiótico (Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina B) al 1 % v/v (BioWhitaker, Walkersville, MD). El crecimiento celular se realizó en recipientes de 75 cm² (TPP, Switzerland) manteniendo las células a una concentración de entre 1×10^5 y 5×10^5 células/ml en un incubador a 37 °C y en una atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂. Los pases se realizaron cada 2-3 días, y no se sobrepasaron los 20 pases. Para el caso de las células MH-S o RAW 264.7, por tratarse de macrófagos adherentes, los pases se realizaron rascando las células con rascador.

Número ATCC: **CRL-2019**

Designación: **MH-S**

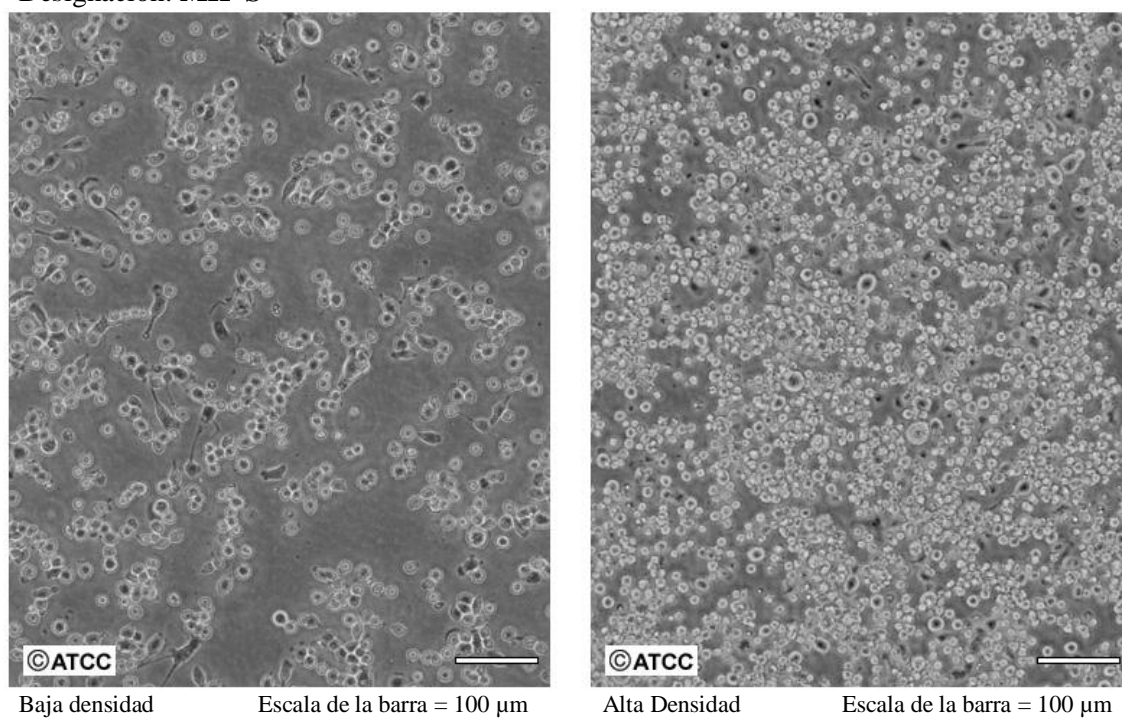


Figura 2: Morfología de las células MH-S por microscopía óptica

Número ATCC: **TIB-71**

Designación: **RAW 264.7**

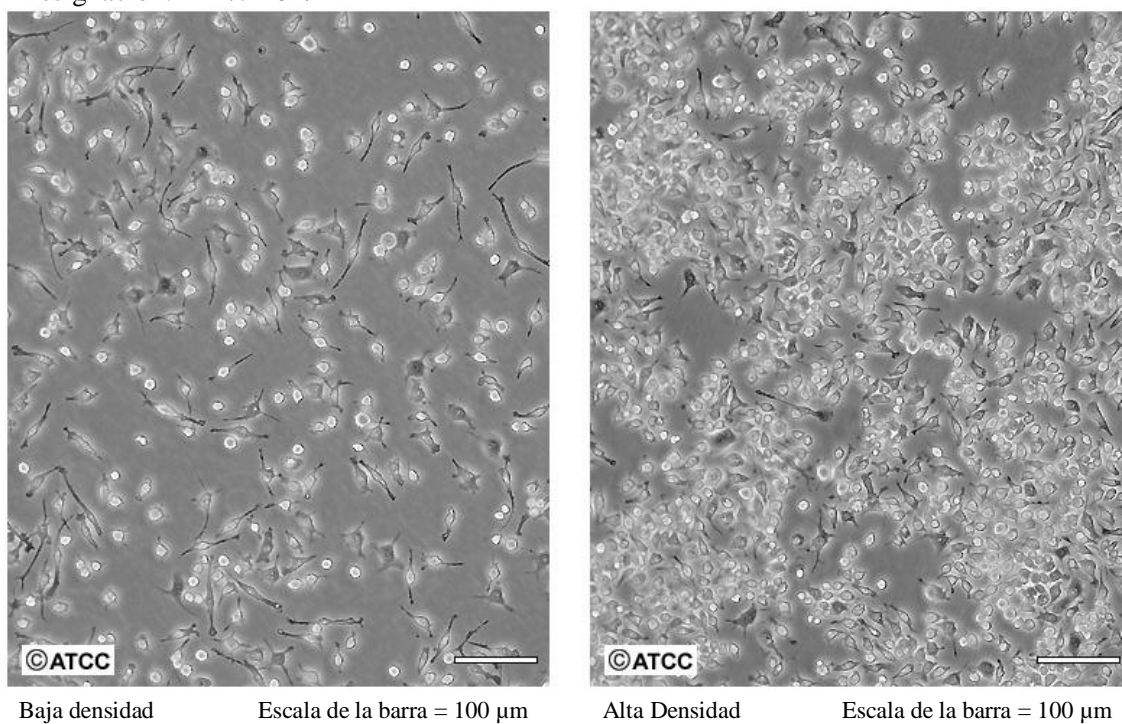


Figura 3: Morfología de las células MH-S por microscopía óptica

3.2. Diferenciación de células U937

Las células se distribuyeron en placas de cultivo (TPP, Switzerland) (1×10^6 células/ml) y se diferenciaron con 10 nM de PMA (Fluka BioChemika, Buchs, Switzerland) durante 24 horas a 37 °C y con el 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo, los pocillos se lavaron con medio fresco para eliminar el PMA y las células no adheridas, y las células adheridas se dejaron reposar otras 24 horas a 37 °C y con el 5 % de CO₂ antes del inicio del experimento.

3.3. Preparación del tacrolimus liposomal o de vesículas de fosfolípidos

Las vesículas de tacrolimus liposomal se prepararon como se indica en (Canadas *et al.* 2004). Brevemente, las cantidades correspondientes de DPPC y POPG (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) (8:2 p/p) (para una concentración final en el pocillo de 0.3 mg/ml) y de tacrolimus (suministrado por Fujisawa GMBH, Munich, Germany) (para cada una de las concentraciones finales utilizadas en los pocillos) se disolvieron en cloroformo/metanol (Scharlau, España) (3:1 v/v) y se llevaron a total evaporación primero en una corriente de nitrógeno y posteriormente en una centrífuga de vacío para eliminar las trazas de disolvente orgánico. Posteriormente la mezcla se hidrató con 1 ml de un tampón Tris/HCl 5 mM, NaCl 150 mM y EDTA 0.1 mM, durante 1 hora a 41 °C en un termomezclador (Eppendorf, Hamburg, Germany) con agitación continua. Posteriormente las vesículas obtenidas se sonicaron para la obtención de vesículas unilamelares a la misma temperatura durante 2 minutos a 400 vatios/ cm² con pulsos de 0.6 segundos distanciados 0.4 segundos en un sonicador Branson Digital modelo 450 con un vástago de 6.4 mm. Aunque la preparación de tacrolimus liposomal resultó ser estable al menos durante el tiempo analizado, siempre se prepararon las vesículas con o sin tacrolimus antes de iniciar los experimentos

3.4. Estimulación de macrófagos

Los experimentos de estimulación se realizaron en medio RPMI 1640, 5% FBS y 1% de antibiótico con LPS liso (*E. coli* 055:B5) (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO). En todos los casos se realizaron triplicados experimentales, y la viabilidad celular se confirmó por exclusión con azul tripán.

Las células U937 diferenciadas a macrófagos o los macrófagos de ratón (MH-S y RAW 264.7) (1×10^6 células/ml) se preincubaron durante 5 minutos con tacrolimus, libre o

liposomal. A continuación se estimularon con LPS (concentración final de 1 µg/ml). Para el caso del ensayo con los inhibidores de endocitosis los pocillos se preincubaron además con nocodazol (agente despolimerizador de tubulina), oligomicina B (agente inhibidor de la ATPasa), bafilomicina (agente neutralizador del pH endosomal, inhibidor de V-ATPasa), monensina (antibiótico que bloquea la ATPasa endosomal) o EIPA (agente inhibidor del transporte de Na⁺) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

Para los experimentos de la determinación de TNF-α, las células se incubaron durante 4 o 24 horas a 37 °C y con el 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 3000 g para eliminar los residuos celulares y se cuantificaron los niveles de TNF-α por ELISA. Para los experimentos de determinación de NF-κB las células se incubaron durante una hora con LPS y posteriormente se realizó la extracción nuclear.

3.5. Ensayos de proliferación celular

Para estudiar si la presencia en el medio de tacrolimus libre o de vesículas de tacrolimus afectaba a la proliferación celular se realizó un ensayo colorimétrico utilizando el compuesto WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se trata de una sal de tetrazolio que en presencia de deshidrogenasas mitocondriales es digerida formando un compuesto de tonalidad rojo oscuro, el formazán, detectable a 450 nm. Una expansión en el número de células viables resulta en un incremento en la actividad de las enzimas mitocondriales de la célula. Este aumento de actividad enzimática produce un incremento en la cantidad de formazán, lo que se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. Las células se incubaron durante 24 horas con distintas concentraciones de tacrolimus, libre o liposomal. 4 horas antes del final del tratamiento se añadió WST-1 a los cultivos celulares. Finalmente, se determinó la absorbancia de las muestras a 450 nm.

3.6. Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar si la presencia en el medio de tacrolimus libre o de vesículas fosfolipídicas con o sin tacrolimus afectaba a la viabilidad celular se realizó un ensayo de fluorescencia con yoduro de propidio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Cuando las células tienen dañada la membrana plasmática, el yoduro de propidio es capaz de entrar al interior celular e intercalarse entre las cadenas de DNA. Las células se incubaron

durante 24 horas con distintas concentraciones de tacrolimus, libre o liposomal. A continuación se incubaron durante 1 hora con 5µg/ml de yoduro de propidio y se midieron las células con la molécula intercalada en sus cadenas de DNA mediante una lectura de fluorescencia ($\lambda_{ex}=540$ nm; $\lambda_{em}=590$ nm). Para poder establecer el porcentaje de viabilidad se incubaron las células durante otra hora con digitonina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), detergente que permeabiliza las membranas permitiendo la entrada de todo el yoduro de propidio, y se realizó la lectura de fluorescencia.

3.7. Microscopía de fluorescencia

Para visualizar la endocitosis de las vesículas lipídicas, las membranas de DPPC/POPG con o sin tacrolimus fueron marcadas fluorescentemente con DiI (Invitrogen, Carlsbad, CA) en una relación molar 200:1 lípido:sonda. Antes de la sonicación de las vesículas éstas se incubaron durante 30 minutos con la sonda disuelta en DMSO a 45 °C y en agitación continua. Las células se diferenciaron de la forma descrita anteriormente sobre pocillos que contenían un cubreobjeto redondo previamente irradiado con luz UV. Las muestras lipídicas se añadieron a una concentración de 0.3 mg/ml durante los tiempos indicados en la Figura 10. A continuación, las células se lavaron con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 3.8 % durante 30 minutos. Para marcar CD14 (receptor de membrana de los macrófagos) las células se bloquearon con PBS y 10 % de FBS y se incubaron con un anticuerpo anti-CD14 de ratón desarrollado en rata diluído 1/100 (eBioscience, San Diego, CA) durante 1 hora. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (AbD Serotec, Kidlington, UK) durante 30 minutos. Finalmente los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos con Mowiol y con 4,6-diamidino-2-felindol (DAPI) 1 µg/ml para teñir los núcleos celulares. Las micrografías se tomaron en un sistema confocal Leica TCS SP2.

3.8. Extracción nuclear

Una vez transcurrida la hora de incubación con LPS las células se lavaron con PBS frío y se rascaron para levantarlas de la placa. A continuación, se centrifugaron a 250 g durante 10 minutos y a 4 °C. Tras volver a lavar con PBS, las células se resuspendieron en un tampón hipotónico para la ruptura de las células (Hepes 10 mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, Tritón X-100 al 0.1% (v/v) y un cocktail de inhibidores de proteasas) y se incubaron en hielo durante 15 minutos. A continuación,

los tubos se centrifugaron a 250 g durante 5 minutos y a 4 °C y el precipitado volvió a resuspenderse en el tampón hipotónico para proceder a la lisis mecánica pasando las células a través de una jeringa con una aguja delgada, y repitiendo el proceso varias veces. Posteriormente, la suspensión de células lisadas se centrifugó a 8000 g durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido, que contiene la fracción nuclear, se resuspendió en el tampón de extracción (Hepes 20 mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 0.42 M, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, Igepal CA-630 al 1 % (v/v), glicerol al 25 % (v/v) y un cocktail de inhibidores de proteasas) y volvió a pasarse por una jeringa para la ruptura de los núcleos. A continuación, la suspensión nuclear se incubó a 4 °C durante 1 hora con agitación suave y se centrifugó a 16000g durante 5 minutos y a 4 °C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante, que contiene el extracto nuclear y que fue lo que se empleó para la cuantificación de NF-κB.

3.9. Cuantificación de TNF-α

La cuantificación de la citoquina proinflamatoria TNF-α se realizó mediante un ELISA, a partir de los sobrenadantes celulares (BD Biosciences, New Jersey, USA). En primer lugar se pegó un anticuerpo anti-TNF-α a los pocillos de una placa de poliestireno (Maxisorp®, Nunc, Rochester, NY) y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Tras una etapa de lavado con PBS/Tween-20 0.05 % (v/v) la placa se bloqueó con PBS/suero bovino fetal 10 % (v/v) para evitar las uniones inespecíficas y se incubó con las distintas muestras donde está presente el TNF-α que se unirá al anticuerpo. Tras otra etapa de lavado para eliminar las proteínas no unidas, la placa se incubó con un segundo anticuerpo anti-TNF-α que se encuentra biotinilado, y con el reactivo estreptavidina peroxidasa que se unirá al anticuerpo biotinilado. Tras un último lavado para eliminar el anticuerpo no unido, se procedió al revelado de la enzima con TMB y una vez parada la reacción con H₂SO₄, se leyó la absorbancia de la placa a 450 nm en un lector de placas de ELISA DIGISCAN (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

3.10. Ensayo de actividad de NF-κB

La cuantificación de NF-κB a partir de los extractos nucleares de las células se realizó mediante un ensayo que combina el principio del EMSA con el del ELISA (Chemicon International, USA). La forma activa de NF-κB la constituyen homodímeros o heterodímeros, siendo el heterodímero p50/p65 el más abundante en células. En este ensayo se determinó la unidad p50, característica de la forma activa de NF-κB, ya que

procede de la escisión de su precursor p105, que es la forma inactiva que está presente cuando NF- κ B se encuentra unida a su inhibidor, I κ B α . Los extractos nucleares se incubaron con un oligonucleótido de doble hebra que se encuentra biotinilado y que contiene la secuencia consenso de unión a NF- κ B (5'-GGGACTTTCC-3'), durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. A continuación la mezcla se incubó en una placa cuyos pocillos se encontraban tapizados con estreptavidina, durante una hora a temperatura ambiente. Tras una etapa de lavado para eliminar todo el material no unido a la placa, ésta se incubó con un anticuerpo primario anti-NF- κ B p50, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras una nueva etapa de lavado los pocillos se incubaron con un anticuerpo secundario anti-rabbit IgG acoplado a peroxidasa, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras una etapa final de lavado se procedió al revelado de la enzima con TMB y, una vez parada la reacción con H₂SO₄, se leyó la absorbancia de la placa a 450 nm en un lector de placas de ELISA DIGISCAN (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

3.11. Determinación del transporte mediado por proteínas de multirresistencia a drogas

Para estudiar si existe algún mecanismo de transporte de fármacos al exterior celular en las U937 se realizó un ensayo de cuantificación por fluorescencia de la calceína intracelular (Hollo *et al.* 1994). Para ello se utilizó la calceína acetoxilmetiléster (Molecular Probes, Eugene, Oregon). Se trata de una molécula altamente liposoluble que atraviesa rápidamente la membrana plasmática de las células por difusión. Es además sustrato tanto de la P-glicoproteína como de la proteína de multirresistencia a drogas MRP, por lo que si alguna de estas proteínas se encontrara presente en la membrana plasmática de estas células la calceína acetoxilmetiléster sería expulsada por ellas al exterior celular. En ausencia de estas proteínas de multirresistencia a drogas la calceína acetoxilmetiléster permanecería en el citoplasma, donde las esterasas presentes romperían el enlace éster, liberándose de esta forma la calceína, que es una molécula hidrofílica y altamente fluorescente (Figura 4).

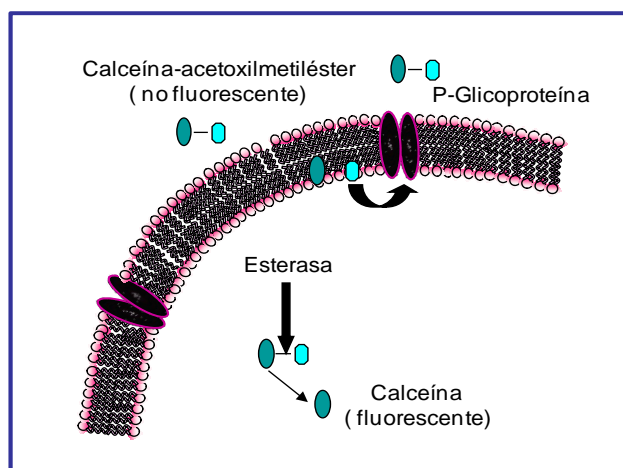


Figura 4: esquema del procedimiento de cuantificación por fluorescencia de la calceína intracelular.

El experimento se realizó incubando las células U937 diferenciadas a macrófagos (1×10^6 células/ml) con dos sustratos de la P-glicoproteína, 2 μM de ciclosporina A o 25 μM de verapamilo, o de la MRP, 0.2 mM de indometacina o 10 mM de probenecida y con 0.25 μM de calceína-acetoximetiléster durante 15 minutos y a 37°C y tras un lavado con PBS se determinó la cantidad de calceína presente en el citoplasma mediante la cuantificación de la fluorescencia, excitando a 488 nm y recogiendo la emisión a 530 nm, en un Fluostar Optima (Offensburg, Germany). Para determinar si el tacrolimus, libre o liposomal, era sustratos de la P-glicoproteína se realizó un experimento similar al descrito, preincubando las células con distintas concentraciones de tacrolimus, libre o liposomal. Además se realizó una determinación de la calceína retenida en el interior celular realizando el experimento de la misma forma pero con una incubación de 60 minutos.

3.12. Análisis estadísticos

Todos los datos representan la media \pm desviación estándar de medidas concretas. Las medias estaban normalmente distribuidas (test de Shapiro-Wilk). Los análisis se realizaron por el test t de Student. Se consideraron diferencias significativas a los valores de $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Actividad antiinflamatoria de tacrolimus

Para determinar el efecto antiinflamatorio del tacrolimus, libre o liposomal, se midieron los niveles de TNF- α secretados al medio por células U937 diferenciadas con PMA durante 24 horas y estimuladas con LPS liso durante 4 o 24 horas en presencia de distintas concentraciones de tacrolimus libre (disuelto en DMSO) o tacrolimus liposomal. La Figura 5 indica que el tacrolimus liposomal inhibió la secreción de TNF- α en macrófagos estimulados con LPS durante 4 horas a partir de concentraciones mucho menores (a partir de 10^{-12} M) que el tacrolimus libre (10^{-5} M). La incubación únicamente con vesículas de fosfolípidos no produjo inhibición en la secreción de TNF- α , lo que indica que el efecto encontrado se debió únicamente a la acción del tacrolimus. Utilizando macrófagos alveolares (MH-S) o peritoneales (RAW 264.7) de ratón observamos que la concentración mínima de tacrolimus libre con efecto parcialmente antiinflamatorio fue $\geq 10^{-5}$ M. Concentraciones inferiores no tuvieron ningún efecto sobre la respuesta proinflamatoria de las células a LPS.

La Figura 6 muestra que tras una incubación de 24 horas el tacrolimus liposomal bloqueó totalmente la secreción de TNF- α por macrófagos estimulados por LPS a concentraciones tan bajas como 10^{-12} M. Sin embargo, el tacrolimus libre sólo disminuyó la secreción de TNF- α en un 40 % a concentraciones $\geq 10^{-5}$ M.

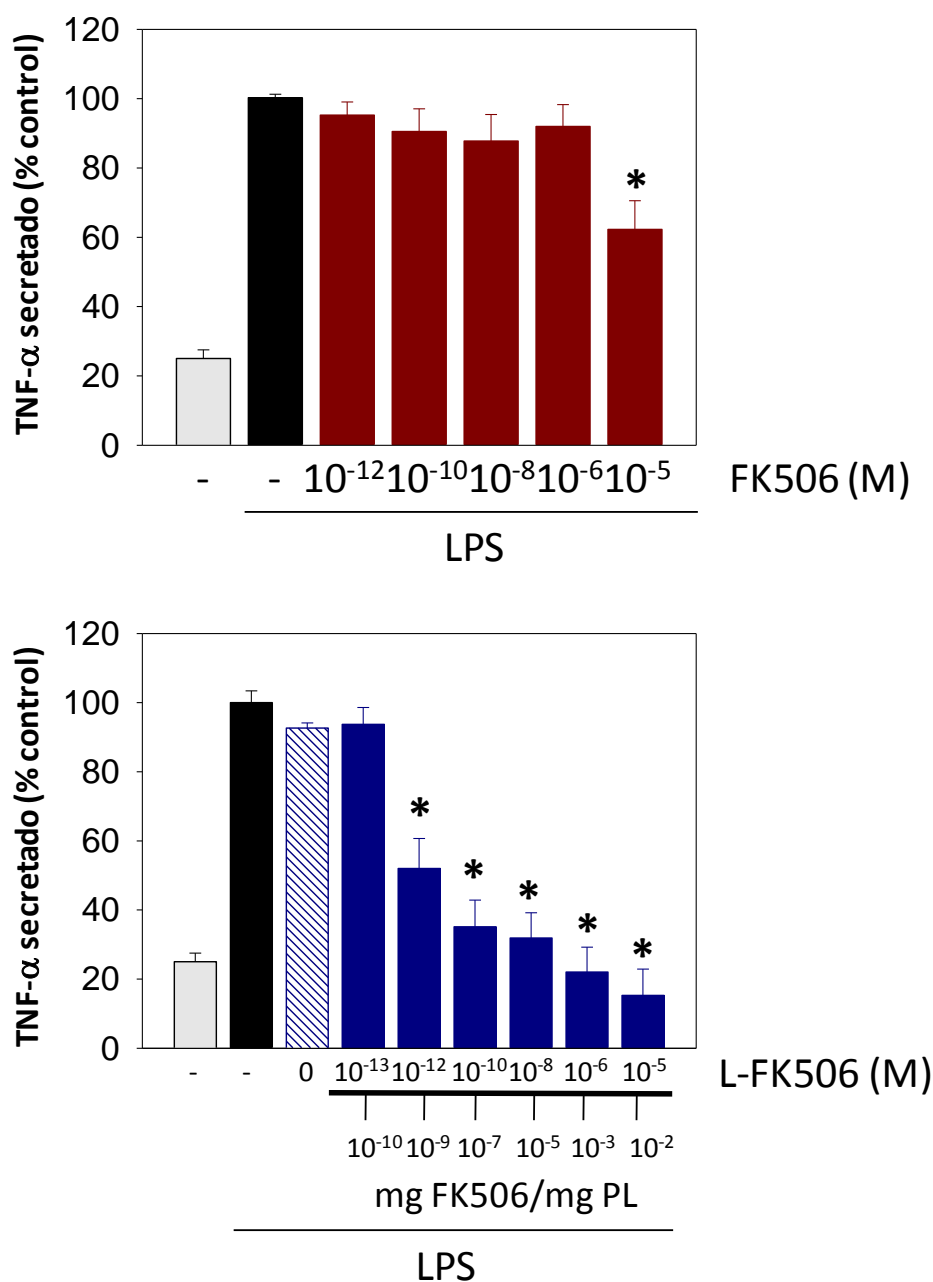


Figura 5: Efecto de tacrolimus libre (FK506) y liposomal (L-FK506) sobre la secreción de TNF- α en células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 4 horas con LPS (1 μ g/ml). La barra rayada de la gráfica inferior representa el efecto de los fosfolípidos (DPPC/POPG, relación 8:2 p:p, concentración final 0.3 mg/ml). Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células diferenciadas y estimuladas con LPS. * $p < 0.05$ vs control positivo.

Para descartar que esta inhibición de la secreción de TNF- α se debiera a una pérdida de viabilidad de las células expuestas al tacrolimus liposomal se realizaron ensayos de proliferación y viabilidad a 24 horas. La Figura 6 muestra que la presencia del tacrolimus, libre o liposomal, en el medio no afectó ni a la proliferación ni a la viabilidad celular, por lo que la inhibición de la secreción de TNF- α se debe exclusivamente al efecto antiinflamatorio del fármaco.

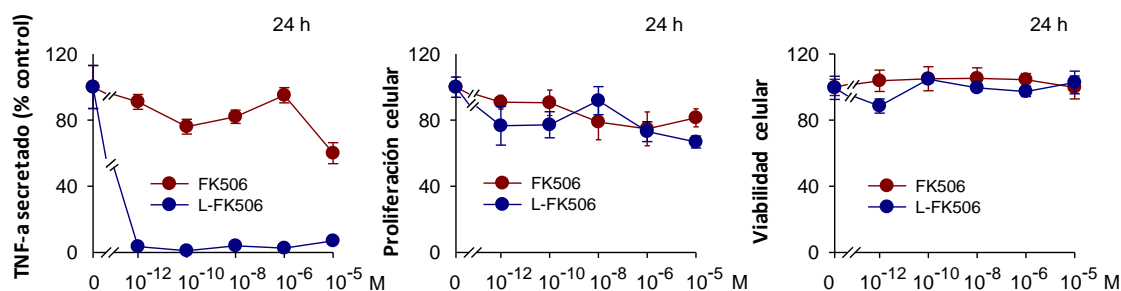


Figura 6: Efecto de FK506 (●) o L-FK506 (●) sobre la secreción de TNF- α en células U937 a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 24 horas con LPS (1 μ g/ml) (izquierda). Efecto de la incubación de FK506 (●) o L-FK506 (●) durante 24 horas sobre la proliferación (centro) y la viabilidad celular (derecha). Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo correspondiente a las células no tratadas.

Para determinar si la secreción de TNF- α ocurre como consecuencia de la activación del factor de transcripción NF- κ B se estudió el efecto del tacrolimus libre o liposomal sobre la presencia de la subunidad p50 de NF- κ B en el extracto nuclear de células U937 diferenciadas a macrófagos y estimuladas con LPS durante 1 hora. La Figura 7 indica que mientras que el tacrolimus liposomal a una concentración de 10^{-7} M fue capaz de disminuir significativamente la presencia de la subunidad p50 en el extracto nuclear de los macrófagos estimulados, el tacrolimus libre no tiene ningún efecto. Estos resultados son similares a los encontrados en el caso de la secreción de TNF- α y sugieren, además, que la capacidad antiinflamatoria del fármaco de reducir la secreción de TNF- α en macrófagos estimulados puede ser debida, al menos en parte, a la reducción en la activación de NF- κ B.

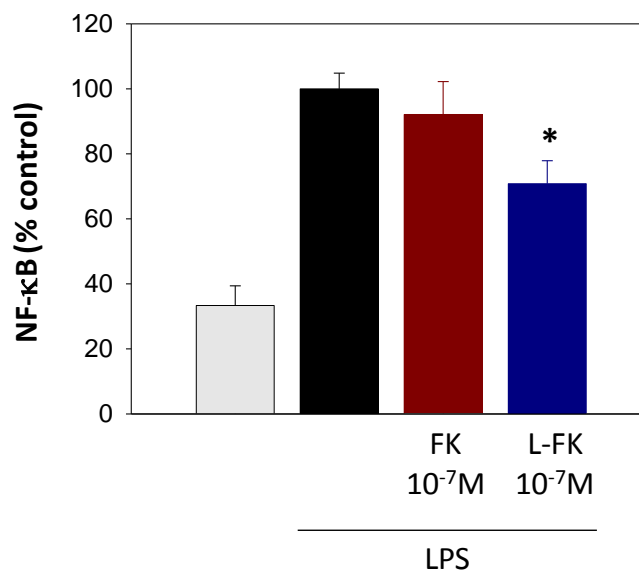


Figura 7: Efecto del tacrolimus libre (FK) o liposomal (L-FK) sobre la presencia de la subunidad p50 de NF-κB en el extracto nuclear de células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 1 hora con LPS (1 µg/ml). Los resultados (media ± desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células diferenciadas y estimuladas con LPS. * $p < 0.05$ vs control positivo.

4.2. Entrada de tacrolimus libre y tacrolimus liposomal en la célula

Para determinar si proteínas de multirresistencia a fármacos están implicadas en la expulsión del tacrolimus al exterior celular se realizó un experimento de captura de calceína acetoximetiléster por las células durante un periodo de 15 minutos en ausencia o presencia de distintos inhibidores de la P-glicoproteína (ciclosporina A y verapamilo) o la MRP (indometacina y probenecida). La Figura 8 indica que la calceína capturada en el citoplasma aumentó significativamente tanto en presencia de la ciclosporina A como del verapamilo, pero no en presencia ni de la indometacina ni de la probenecida. Estos resultados sugieren que la P-glicoproteína, pero no la MRP, está presente en la membrana celular de U937 diferenciadas a macrófagos ya que se está estableciendo una competencia entre la ciclosporina A o el verapamilo y la calceína-acetoximetiléster por la unión a la P-glicoproteína, que impide su salida de la célula y por tanto un aumento en la calceína intracelular.

Para estudiar si el tacrolimus liposomal es sustrato de la P-glicoproteína se realizó el mismo ensayo de captura de calceína utilizando distintas concentraciones de tacrolimus libre o liposomal. La Figura 8 muestra que el porcentaje de calceína capturada en el citoplasma aumentó significativamente con concentraciones crecientes de tacrolimus libre pero que la incubación con tacrolimus liposomal no produjo un aumento del porcentaje de calceína intracelular, lo que demuestra que el tacrolimus libre es sustrato e inhibidor de la P-glicoproteína y que el tacrolimus liposomal no es sustrato de la P-glicoproteína. Estos resultados explican las diferencias encontradas en cuanto a la capacidad antiinflamatoria del fármaco cuando se encuentra libre o en forma liposomal, ya que aunque la concentración de tacrolimus depositada en el medio es la misma en ambos casos, la cantidad real que entra en la célula y que por tanto puede unirse a la FKBP y ejercer su efecto intracelular es varios órdenes de magnitud mayor cuando se encuentra en forma liposomal.

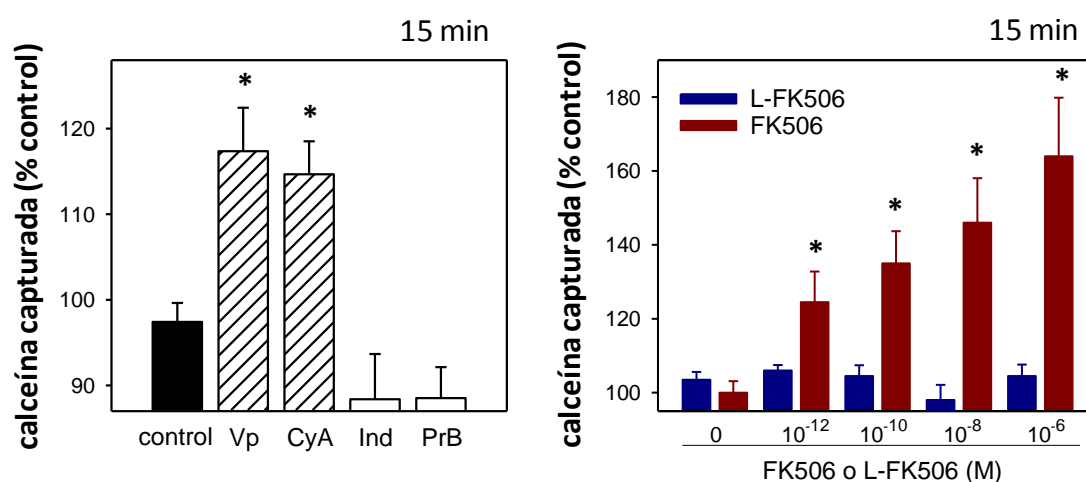


Figura 8: Caracterización de la captura de calceína en células U937 en presencia de distintos inhibidores de las proteínas de multirresistencia a drogas P-glicoproteína (verapamilo (Vp, 25 μ M), ciclosporina A (CyA, 2 μ M) o MRP (indometacina (Ind, 0.2 mM), probenecida (PrB, 10 mM) (izquierda). Efecto de distintas concentraciones de tacrolimus libre (FK506) o liposomal (L-FK-506) sobre la captura de calceína (derecha). Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control correspondiente a la calceína capturada en ausencia de inhibidores o de tacrolimus libre o liposomal. * $p < 0.05$ vs control.

Para determinar si este efecto se mantiene a lo largo del tiempo se realizó un experimento de determinación de la calceína retenida en el citoplasma a los 60 minutos.

La Figura 9 indica que los resultados son similares a los encontrados a los 15 minutos, ya que mientras que en presencia tanto de ciclosporina A como de tacrolimus libre el porcentaje de calceína retenida aumentó significativamente con respecto al control, la incubación con tacrolimus liposomal no supuso un aumento de la retención de calceína intracelular, lo que corrobora que el tacrolimus liposomal no es sustrato de la P-glicoproteína.

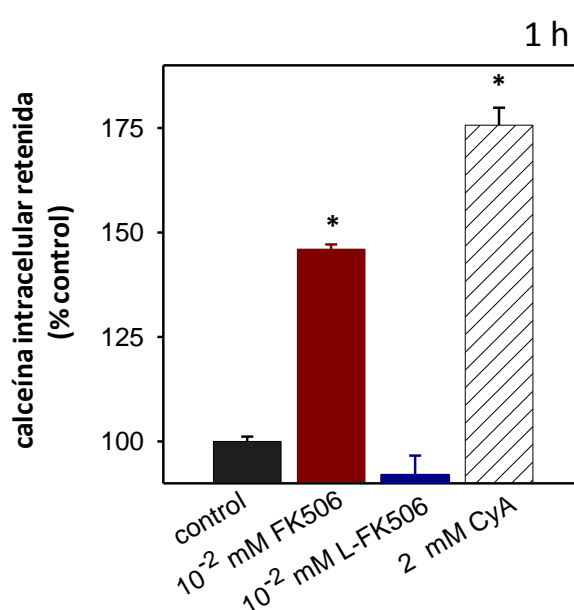


Figura 9: Efecto de 10^{-2} mM de tacrolimus libre o liposomal sobre la calceína intracelular retenida tras una incubación de 60 minutos. Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control correspondiente a la calceína intracelular retenida en ausencia de inhibidores o de tacrolimus libre o liposomal. * $p < 0.05$ vs control.

Para investigar el mecanismo de entrada de los liposomas de tacrolimus en los macrófagos se realizó un ensayo de localización de los mismos por microscopía confocal en la línea de macrófagos alveolares de ratón MH-S. Para ello las células se incubaron durante 5 distintos tiempos con las vesículas de fosfolípidos o de tacrolimus liposomal marcadas con la sonda DiI. A continuación las células se fijaron, se marcaron con un anticuerpo anti-CD14 (para localizar las membranas plasmáticas) y se tiñeron con DAPI (para localizar los núcleos celulares). La Figura 10 indica que a los 5 minutos

de su adición las vesículas de tacrolimus liposomal se localizaron en la membrana plasmática (al igual que CD14) y a las 4 horas en el interior celular. Estos resultados demuestran que el tacrolimus liposomal está entrando al interior de la célula y que a las 4 horas las vesículas están presentes en el citoplasma.

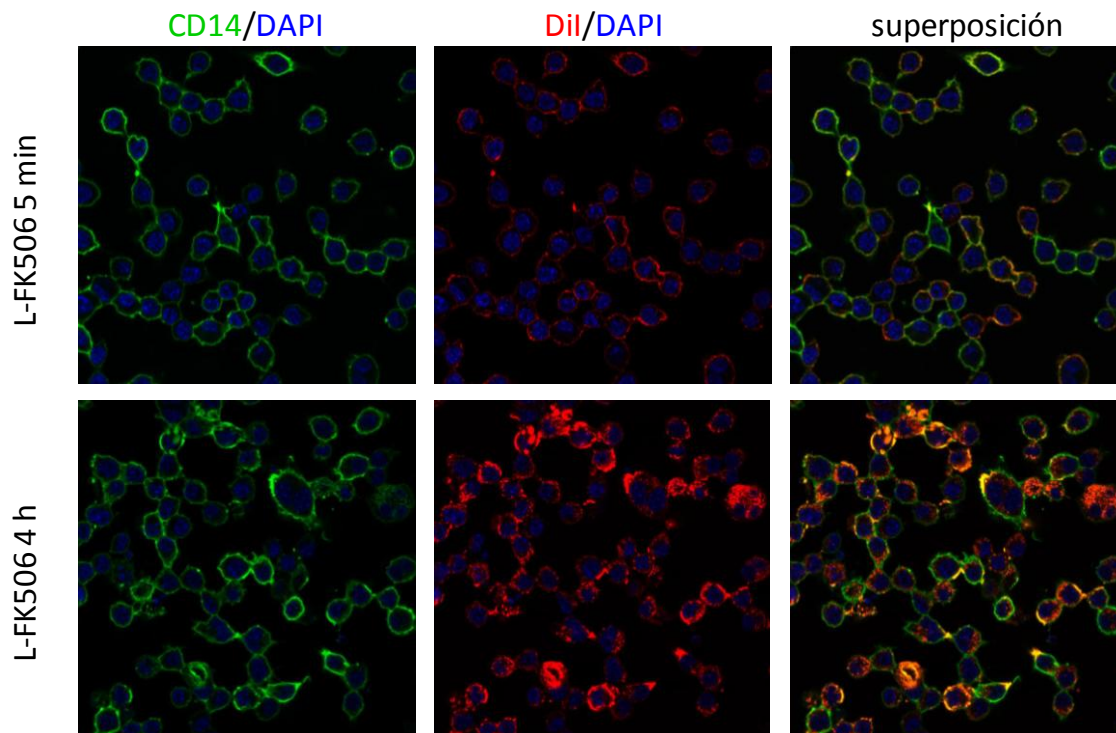


Figura 10: Imagen tomada por microscopía confocal de células MH-S incubadas con tacrolimus liposomal (L-FK506, concentración de tacrolimus 10^{-5} M, concentración de DPPC/POPG 0.3 mg/ml) marcado con DiI (rojo) durante 5 minutos o 4 horas, fijadas, marcadas con un anticuerpo anti-CD14 (verde) y teñidas con DAPI.

Por otra parte, se determinaron los niveles de $\text{TNF-}\alpha$ preincubando las células durante 30 minutos en presencia de distintos inhibidores de endocitosis y de una concentración de tacrolimus liposomal con alto efecto antiinflamatorio. La Figura 11 muestra que el efecto antiinflamatorio de tacrolimus liposomal fue total parcialmente revertido por la presencia en el medio de distintos inhibidores de endocitosis, lo que sugiere que el fármaco administrado de forma liposomal está siendo internalizado vía endocitosis.

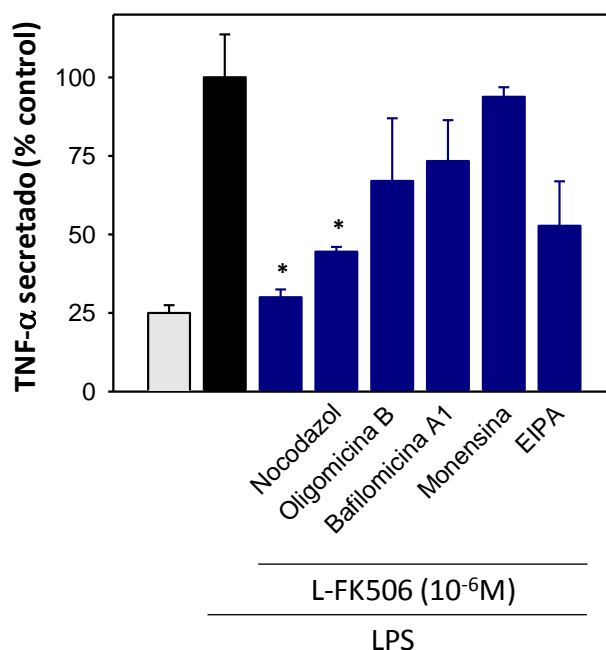


Figura 11: Efecto de tacrolimus liposomal (L-FK506, 10^{-6}M) sobre la secreción de TNF- α en células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 4 horas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) en presencia de distintos inhibidores de endocitosis: nocodazol (10 μM), oligomicina B (10 $\mu\text{g/ml}$), bafilomicina A1 (0.2 μM), monensina (25 μM) y EIPA (100 μM). Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células diferenciadas y estimuladas con LPS. * $p < 0.05$ vs control positivo.

Estos resultados nos permiten concluir que mientras que el tacrolimus libre entra por difusión a través de la membrana plasmática y es expulsado al exterior celular por la acción de la P-glicoproteína, cuando se encuentra en forma liposomal entra por endocitosis que evita su expulsión por la P-glicoproteína. De esta forma, aunque la concentración administrada de tacrolimus libre o liposomal sea la misma, el efecto antiinflamatorio es varios órdenes de magnitud mayor cuando el fármaco está encapsulado en nanoliposomas.

5. DISCUSIÓN

En este capítulo se ha abordado el estudio de la capacidad antiinflamatoria de una preparación liposomal de tacrolimus sobre macrófagos activados por LPS, células clave en la respuesta inflamatoria en el pulmón. Nuestro objetivo es administrar tacrolimus

liposomal intratraquealmente, ya que el pulmón es un excelente portal de entrada de fármacos poco explorado todavía. Por ello el tacrolimus se ha encapsulado en vesículas de fosfolípidos característicos del surfactante pulmonar (DPPC y POPG). Este tipo de lípidos no produciría toxicidad sino que contribuiría a mejorar la función pulmonar en estados patológicos en los que el surfactante está alterado.

La capacidad antiinflamatoria de distintas concentraciones de tacrolimus incorporado en vesículas unilamelares de DPPC/POPG (relación en peso 8:2) se comparó con la del tacrolimus libre. Este estudio demuestra que el tacrolimus liposomal tiene un efecto antiinflamatorio mucho mayor que el tacrolimus libre en macrófagos estimulados con LPS, ya que mientras que concentraciones de 10^{-5} M de tacrolimus libre fueron necesarias para lograr una inhibición parcial de la secreción de TNF- α , concentraciones tan bajas como 10^{-12} M de tacrolimus liposomal, que corresponde a una relación en peso de 10^{-9} mg tacrolimus/mg fosfolípido, fueron suficientes para bloquear la secreción de TNF- α . El tratamiento de los macrófagos con las vesículas unilamelares de DPPC/POPG en ausencia del fármaco no tiene ningún efecto sobre la secreción de TNF- α observados en las células estimuladas en ausencia de estas vesículas. Por tanto, el efecto antiinflamatorio se debe exclusivamente al tacrolimus encapsulado en las vesículas. Además, ni el tacrolimus libre ni las vesículas de fosfolípidos con o sin tacrolimus resultaron tóxicas para las células a las concentraciones ensayadas, por lo que el efecto antiinflamatorio observado se debió únicamente a la acción antiinflamatoria del fármaco sobre los macrófagos estimulados.

Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la respuesta inmunosupresora de tacrolimus liposomal sobre linfocitos T se detecta más tarde que la del tacrolimus libre (Canadas *et al.* 2004). Este retardo sugería que el mecanismo por el cual el fármaco libre y tacrolimus liposomal entra en las células es diferente. Los ensayos de captura de calceína demuestran que el tacrolimus liposomal, al contrario que la forma libre, no es sustrato de la proteína integral de membrana plasmática P-glicoproteína, cuya acción es transportar una serie de moléculas anfipáticas desde la cara citosólica de la membrana celular a la cara extracelular. Los estudios de captura de calceína con inhibidores de esta proteína de multirresistencia a drogas demuestran que se expresa y es activa en células U937 diferenciadas a macrófagos, lo que concuerda con otros estudios que demuestran la presencia de la P-glicoproteína en este tipo celular (Combates *et al.* 1997). La

vehiculización de tacrolimus en vesículas de fosfolípidos permite que se alcance una mayor concentración de tacrolimus intracelular al no ser expulsado el fármaco al exterior por la P-glicoproteína

Por otra parte, experimentos de microscopía confocal en los que las vesículas lipídicas se marcaron con DiI y las células con anti-CD14 y con DAPI, indicaron que las vesículas son endocitadas por las células a partir de los 30 minutos de incubación. Además, experimentos de secreción de TNF- α por macrófagos estimulados con LPS en presencia de distintos inhibidores de endocitosis y de vesículas fosfolipídicas con o sin tacrolimus demostraron que la anulación parcial o total del proceso de endocitosis anula parcial o totalmente el efecto antiinflamatorio del tacrolimus liposomal. Los inhibidores de endocitosis utilizados fueron: el nocodazol, como agente despolimerizador de microtúbulos, impidiendo por tanto la formación del citoesqueleto (Janmey 1998); la monensina, inhibiendo la acidificación de los endosomas (Mollenhauer *et al.* 1990); el EIPA, como inhibidor del transporte de sodio en el endosoma (Gekle *et al.* 1999); y la bafilomicinas A1 y la oligomicina B bloqueando la bomba de protones de las vesículas endosomales y lisosomales (Lukacs *et al.* 1990) (Tapper and Sundler 1995). De ellos, los que mostraron mayor efecto fueron la monensina, la bafilomicina A1 y la oligomicina, siendo el nocodazol el que mostró menor efecto. Experimentos recientes con microscopía confocal no mostrados en esta memoria indican que se produce un bloqueo total con amantadina 2.5 mM y monodansilcadaverina 100 μ M, que son inhibidores de la endocitosis mediada por clatrina. Sin embargo, la nistatina, inhibidor de endocitosis caveolar, tiene poco efecto. Estos resultados concuerdan con otros estudios que demuestran que los liposomas de un tamaño \leq 200 nm (como es el caso de las vesículas unilamelares utilizadas en este estudio) entran al interior celular por endocitosis dependiente de clatrina (Rejman *et al.* 2004).

La multirresistencia a fármacos por la acción de proteína de multirresistencia a drogas como la P-glicoproteína o la MRP es un obstáculo importante en el tratamiento con fármacos de procesos tumorales. Una de las estrategias para evitar este problema consiste, precisamente, en el uso de liposomas (Mamot *et al.* 2003). Hay estudios que demuestran que la vehiculización de moléculas en liposomas evita su expulsión por la P-glicoproteína (Kang *et al.* 2009). Además, la utilización de inmunoliposomas (liposomas con un anticuerpo frente a algún receptor de la célula diana) podría facilitar

la entrada de determinadas vesículas en la célula, y por consiguiente de la molécula internalizada o encapsulada en su membrana (Kobayashi *et al.* 2007) (Huwyler *et al.* 2002). Nuestros resultados demuestran que las vesículas de DPPG/POPG con o sin tacrolimus entran en la célula por endocitosis, lo que evita la expulsión del fármaco por la P-glicoproteína. En contraste, el fármaco libre, debido a su carácter hidrofóbico y su coeficiente de partición celular entre la membrana y el medio acuoso de 3.9×10^{-3} M, se incorpora eficientemente en la hoja externa de la membrana plasmática. Su carácter hidrofóbico le permite un movimiento transversal de la cara externa a la cara citosólica de la membrana plasmática donde interacciona con la FKBP. En el caso de los macrófagos, pero no de los linfocitos T, la expresión de la P-glicoproteína es responsable del movimiento transmembracional inverso (de la cara citosólica a la cara extracelular) lo que impide la acción del fármaco a concentraciones nanomolares. En todos los estudios publicados respecto a la acción de tacrolimus libre sobre macrófagos se requieren concentraciones de fármaco $\geq 10 \mu\text{M}$ para observar algún efecto (Hamalainen *et al.* 2002) (Kang *et al.* 2007). De ahí la ausencia de datos concluyentes sobre los mecanismos de inmunomodulación de tacrolimus sobre macrófagos, mientras que en linfocitos T han sido ampliamente descritos (Fruman *et al.* 1992) (Plosker and Foster 2000).

Nuestros resultados, utilizando tacrolimus liposomal, indican que el tacrolimus inhibió la activación de NF- κ B de forma significativa. Se requieren estudios adicionales para saber si el tacrolimus afecta a otras vías de señalización inducidas por LPS, tales como la activación por fosforilación de MAP quinasas (ERK, p38 y JNK) así como la activación por fosforilación de Akt (implicada en la ruta de PI3K). Asimismo es importante conocer qué papel juega la calcineurina en macrófagos. Estudios recientes han demostrado que la calcineurina está activada e implicada en las cascadas de señalización que conducen a la producción de óxido nítrico (otra de las moléculas secretadas por los macrófagos estimulados por LPS) mediada por NF- κ B (Kim *et al.* 2004) y que este efecto está inhibido por el tratamiento con tacrolimus (Hamalainen *et al.* 2002). No obstante, hay por otra parte estudios que sugieren que la calcineurina no sería necesaria para la inducción transcripcional del gen de TNF- α en macrófagos estimulados (Tsai *et al.* 2000) o células dendríticas (Zanoni *et al.* 2009) o que incluso tendría un efecto de regulación negativa de las cascadas de señalización que conducen a la síntesis de TNF- α (Kang *et al.* 2007).

Es posible que el tacrolimus estuviera inhibiendo la secreción de TNF- α e través de un mecanismo independiente de la calcineurina. (Comalada *et al.* 2003) demuestran que el efecto del tacrolimus sobre la proliferación de los macrófagos es independiente de la actividad de la calcineurina y sugieren que el tacrolimus podría inhibir la actividad peptidil prolil *cis-trans* isomerasa (PPIasa) de la inmunofilina (FKBP) a la que se une en el citoplasma, ya que se ha demostrado *in vitro* que el tacrolimus inhibe la actividad PPIasa de la FK-BP12 (Schreiber 1991). Esta inhibición podría de alguna forma impedir el plegamiento de proteínas implicadas en las cascadas de señalización que conducen a la proliferación de los macrófagos. Además hay otro estudio reciente que demuestra que el tacrolimus tiene la capacidad de inhibir la cascada de señalización de JNK y p38 de forma independiente a la calcineurina en linfocitos T (Matsuda *et al.* 2000). Nuestros resultados demuestran que en células U937 diferenciadas a macrófagos la inhibición de TNF- α es dependiente, pero solo en parte, de la activación de NF- κ B, por lo que cabría la posibilidad de que el tacrolimus estuviera inhibiendo la secreción de TNF- α a través de la ruta de las MAP quinasas.

La gran capacidad antiinflamatoria del tacrolimus vehiculizado en vesículas unilamelares de DPPC/POPG convierte a esta preparación liposomal en una estrategia prometedora para la administración intratraqueal del fármaco en patologías respiratorias que cursan con una respuesta inflamatoria exacerbada, entre ellos el daño por isquemia reperusión tras un transplante pulmonar. El hecho de que los fosfolípidos que componen la vesícula sean los característicos del surfactante pulmonar evitaría posibles efectos adversos sobre dicho surfactante, ya que se trata de un sistema complejo que podría verse afectado por una alteración en su composición. Las preparaciones liposomales que se han ensayado hasta ahora suelen estar formadas por fosfatidilcolina y colesterol, y además, de acuerdo con resultados de nuestro grupo, están preparadas a un porcentaje molar superior al límite de incorporación de tacrolimus en vesículas, que es del 1 mol % (Canadas *et al.* 2004) por lo que podría haber agregados de tacrolimus asociados a las partículas. El uso de colesterol en proporciones altas no es aconsejable ya que podría inhibir la función del surfactante. Hay surfactantes naturales de origen bovino que se utilizan en clínica para el tratamiento del síndrome de distrés respiratorio del neonato a los que se ha eliminado el colesterol. La ventaja de utilizar fosfolípidos del surfactante es que también contribuirían a una mejora de la función pulmonar, ya que hay estudios que demuestran que los fosfolípidos endógenos del surfactante

pulmonar se encuentran afectados negativamente en el daño por isquemia isquemia reperfusión tras un trasplante de pulmón (Casals *et al.* 1998) (Valino *et al.* 2004).

En resumen, los resultados demuestran que la preparación liposomal de tacrolimus posee un efecto antiinflamatorio marcadamente mayor que el tacrolimus libre sobre macrófagos estimulados con LPS. Esto se debe a que el tacrolimus liposomal está entrando al interior de la célula por endocitosis, lo que evita su expulsión por la P-glicoproteína a la cara externa de la membrana celular. Por tanto, su concentración intracelular es mucho mayor que la del tacrolimus libre y como consecuencia sus efectos antiinflamatorios, como lo demuestran los resultados de este estudio. Por tanto, esta preparación de tacrolimus liposomal puede ser una formulación adecuada para la administración del fármaco por vía intratraqueal en enfermedades pulmonares que cursen con inflamación.

CAPÍTULO 2

Efecto beneficioso de la administración intratraqueal de tacrolimus liposomal en transplante de pulmón experimental

1. RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar el potencial efecto beneficioso de la administración intratraqueal de tacrolimus encapsulado en nanoliposomas de composición similar a las membranas del surfactante pulmonar, para paliar el daño por isquemia-reperfusión tras el trasplante de pulmón.

MÉTODOS: El trasplante de pulmón se realizó en cerdos cruce de las razas Landrace x Large-White. Los animales se dividieron en tres grupos: i) Grupo tratado con tacrolimus liposomal (0.2 mg FK506/25 mg fosfolípido/kg peso) siendo el volumen de instilación 2.5 ml/kg; ii) Grupo tratado con liposomas (25 mg fosfolípidos/2.5 ml/kg peso); y iii) Grupo de animales no tratado, en los que se instiló el mismo volumen (2.5 ml/kg) de suero salino. En todos los casos las soluciones se instilaron a 37 °C en el pulmón izquierdo del donante, antes de la extracción y preservación de los pulmones durante 22 horas en frío. La función pulmonar se midió en los receptores en condiciones basales y durante las 2 primeras horas de reperfusión. A partir del lavado broncoalveolar se obtuvo el precipitado celular para su estudio por citometría de flujo, y se analizaron marcadores de daño e inflamación y la composición y función del surfactante pulmonar.

RESULTADOS: Los resultados indican que el tratamiento con tacrolimus liposomal en el donante da lugar a la recuperación de la oxigenación arterial en el receptor debido a una clara disminución de la inflamación en el pulmón transplantado y a la recuperación de la composición y funcionalidad del surfactante pulmonar. El tratamiento con tacrolimus liposomal previene: i) la infiltración de neutrófilos en el espacio alveolar; ii) el incremento de marcadores inflamatorios en el fluido alveolar; iii) la extravasación de proteínas plasmáticas al alveolo; y iv) la peroxidación lipídica y carbonilación de proteínas en la fracción activa del surfactante, que causan su inactivación.

CONCLUSIÓN: Estos estudios demuestran que la administración intratraqueal de tacrolimus liposomal en el donante reduce significativamente el daño por isquemia-reperfusión tras el trasplante de pulmón y podría ser efectivo también en enfermedades respiratorias que cursan con una respuesta inflamatoria exacerbada.

2. INTRODUCCIÓN

El trasplante de pulmón es el último recurso terapéutico para pacientes con determinadas enfermedades respiratorias, tales como fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o hipertensión pulmonar

primaria, para las que no existe ningún tratamiento alternativo (Woo 2008). Aproximadamente un 10-25% de los receptores de un trasplante de pulmón sufren daño severo por el proceso de isquemia-reperfusión lo que conduce a la denominada disfunción primaria del injerto en el transcurso de las 72 horas posteriores al trasplante, siendo ésta la primera causa de mortalidad inmediata tras el trasplante (de Perrot *et al.* 2003a). El daño por isquemia-reperfusión está caracterizado clínicamente por hipoxemia, hipertensión, disminución de la distensibilidad pulmonar y edema (Lee and Christie 2009). El daño por isquemia-reperfusión compromete la funcionalidad pulmonar tanto en estadios tempranos produciendo rechazo agudo (Christie *et al.* 2005b) como tardíos, con enfermedades crónicas asociadas, como la bronquiolitis obliterante (Daud *et al.* 2007).

El daño por isquemia-reperfusión es un proceso inflamatorio complejo en el que están implicados distintos tipos celulares, fundamentalmente macrófagos alveolares en la etapa temprana y neutrófilos en la tardía (Eppinger *et al.* 1995) (Eppinger *et al.* 1997) (Wagner and Roth 2000), aunque también participan linfocitos (de Perrot *et al.* 2003b) (Geudens *et al.* 2007), células endoteliales (McCourtie *et al.* 2008a) y neumocitos tipo II (Sharma *et al.* 2007) (McCourtie *et al.* 2008b). Todos ellos liberan gran cantidad de mediadores inflamatorios que afectan al endotelio capilar y al epitelio alveolar, lo que produce una grave alteración de la barrera alveolo-capilar con la consecuente aparición de edema pulmonar. El daño en el epitelio alveolar perjudica gravemente a los neumocitos tipo II y por tanto a la producción del surfactante pulmonar (Fehrenbach 2001), cuya funcionalidad se ve además afectada debido a su inactivación por diversas proteínas plasmáticas y/o mediadores inflamatorios. La alteración del surfactante desencadena a su vez el incremento de infiltraciones alveolares y la aparición de zonas atelectásicas (Casals *et al.* 1998) (Valino *et al.* 2004) lo que conduce a la perpetuación del daño.

A pesar de los avances que se han realizado para su prevención, el daño por isquemia-reperfusión sigue constituyendo uno de los problemas fundamentales a los que se enfrentan los receptores de un trasplante de pulmón. Por este motivo, se hace necesaria la búsqueda de estrategias terapéuticas que amortigüen el daño inflamatorio. Hay evidencias que indican que el tacrolimus administrado por vía muscular o intravenosa antagoniza el daño por isquemia-reperfusión en órganos tales como cerebro (Giordani *et*

al. 2003), riñón (Yang *et al.* 2001), hígado (St Peter *et al.* 2003b) (Arias-Díaz *et al.* 2009), corazón (Squadrito *et al.* 2000) y pulmón (Krishnadasan *et al.* 2002). Además, hay estudios que indican que la administración intratraqueal de tacrolimus disuelto en etanol tiene un efecto beneficioso en el tratamiento del rechazo agudo y crónico del injerto (Schrepfer *et al.* 2007) aunque el etanol causa irritación de las vías respiratorias. Por otra parte, estudios en modelos de trasplante de pulmón en los que se compara la administración de tacrolimus intramuscular o por inhalación de micropartículas (Ingu *et al.* 2005) (Ide *et al.* 2007) indican que la administración del fármaco por vía inhalatoria es más eficaz y minimizaría los efectos adversos de la administración sistémica, debidos, en parte, al excipiente (aceite de castor hidrogenado) en el que se prepara el tacrolimus, de carácter liposoluble.

Nuestro grupo ha desarrollado una preparación de tacrolimus (L-FK506) utilizando vesículas semejantes a las membranas del surfactante pulmonar para ser administrado intratraquealmente (Canadas *et al.* 2004). Nuestra hipótesis es que la vehiculización de tacrolimus en estos liposomas podría asegurar la llegada del fármaco a los espacios alveolares sin afectar negativamente la composición y funcionalidad de las membranas del surfactante.

El objetivo de este capítulo es analizar la efectividad de esta nueva formulación en un modelo de trasplante de pulmón en cerdo, determinando si el tratamiento intratraqueal de L-FK506 en el donante:

- a) Aumenta la oxigenación en el animal receptor
- b) Disminuye la inflamación asociada a la isquemia-reperfusión en pulmones transplantados
- c) Mejora la composición y actividad biofísica del surfactante pulmonar de pulmones transplantados

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación de FK506 liposomal o de vesículas de fosfolípidos

El tacrolimus liposomal se preparó a una concentración de 8×10^{-3} mg FK506/ mg fosfolípido de la manera siguiente: se disolvieron 500 mg de DPPC (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), 125 mg de POPG (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)

(DPPC/POPG 8:2 p/p) y 5 mg de FK506 (suministrado por Fujisawa GMBH, Munich, Germany) en 10 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v) (Scharlau, España) y el disolvente orgánico se evaporó totalmente en un rotavapor Buchi R. A continuación, la mezcla de fosfolípidos y fármaco se hidrató en suero salino estéril a una temperatura 10 °C superior a la temperatura de transición de fase de la mezcla (32.5 °C) (Canadas *et al.* 2004) durante 1 hora en un baño Unitronic 320 OR con agitación continua. Las vesículas multilamelares obtenidas se sonicaron a la misma temperatura durante 2 minutos a 400 vatios/cm² con pulsos de 0.6 segundos distanciados 0.4 segundos en un sonicador Branson Digital modelo 450 con un vástago de 6.4 mm. El diámetro hidrodinámico de las vesículas unilamelares formadas se determinó mediante dispersión de luz dinámica tal y como se describe en (Canadas *et al.* 2004). La preparación de tacrolimus liposomal y de vesículas unilamelares de DPPC/POPG (8:2, p/p) sin tacrolimus se llevo a cabo siempre en condiciones estériles.

3.2. Animales y grupos experimentales

Para la realización de 18 trasplantes pulmonares unilaterales izquierdos se utilizaron 36 cerdos, cruce de las razas Landrace x Large-White, de 2 a 3 meses de edad y de pesos comprendidos entre 19 y 23 Kg. Una vez que ingresan en el Servicio de Colonia de Animales del Hospital Universitario "Clínica Puerta de Hierro", son estabulados, observados durante una semana y alimentados "ad libitum" con harina de cebada (Lanzadera 90 Plus. Purina). Previamente al experimento de trasplante, cada animal es separado del resto de animales y estabulado de manera independiente sometiénolo a un ayuno de 24 horas de ingesta sólida y 4 horas de privación de agua.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos de estudio:

- i) **NT:** Grupo no tratado (n =12, 6 donantes y 6 receptores), en los que se instiló suero salino al pulmón izquierdo del donante.
- ii) **L-FK:** Grupo tratado con tacrolimus liposomal (L-FK506) (n =12, 6 donantes y 6 receptores), en los que se instiló L-FK506 al pulmón izquierdo del cerdo donante.
- iii) **Lip:** Grupo tratado con liposomas (n =12, 6 donantes y 6 receptores), en los que se instilaron liposomas en el pulmón izquierdo del donante de composición y características similares a los utilizados para encapsular el fármaco.

El estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital Puerta de Hierro. El cuidado de los animales se atuvo a las normativas española y europea dictadas en este sentido, así como a las estipuladas por “*The Principles of Laboratory Animal Care*” y “*Guide for the care and use of Laboratory animals*”, editadas por la *National Society for Medical Research* y *National Academy of Sciences*, respectivamente.

3.3. Técnica quirúrgica

El trasplante lateral de pulmón izquierdo se llevó a cabo en los quirófanos del Servicio de Cirugía Experimental de la Clínica Universitaria Puerta de Hierro de Madrid según los procedimientos descritos en (Varela *et al.* 1997) (Casals *et al.* 1998) (Valino *et al.* 2004) (Figura 1).

Anestesia

Todos los animales, donantes y receptores, fueron premedicados con una mezcla de ketamina (20 mg/kg), diazepam (0.1 mg/kg) y atropina (0.02 mg/kg) por vía intramuscular. La inducción anestésica se realizó con un bolus de propofol (2 mg/kg) administrado por vía i.v. en la vena marginal de la oreja. Una vez conseguido el plano anestésico adecuado, se procedió a la intubación endotraqueal y conexión a un ventilador Adult Star® Infrasonics Inc. (San Diego, CA. USA). Los parámetros del ventilador fueron ajustados en función del peso del animal con el objetivo de mantener unos valores de CO₂ al final de la expiración entre 30 y 40 mmHg y una presión pico de la vía aérea entre 15 y 20 cm H₂O. Se ajustó el volumen corriente en 10 ml/kg, PEEP de 5 cm H₂O, con un flujo inspiratorio calculado para conseguir una relación inspiración/expiración de 1:2.

La cateterización de la vena yugular externa izquierda se realizó para la administración de los anestésicos y la fluidoterapia necesaria durante la intervención quirúrgica. Por otro lado, se realizó la cateterización de la vena yugular externa derecha para la inserción de un catéter de Swan-Ganz que se utilizó para el registro de la presión de la arteria pulmonar, la presión capilar pulmonar, la presión venosa central, la temperatura y el gasto cardíaco. La cateterización de la arteria carótida común izquierda se llevó a cabo para el registro de la presión arterial invasiva en el equipo para monitorización hemodinámica.

Tras una dosis i.v. de carga de midazolam (0.6 mg/kg) y fentanilo (5 µg/kg), el mantenimiento anestésico se realizó administrando por vía i.v. y en infusión continua propofol (9 mg/kg/h), midazolam (0.6 mg/kg/h), fentanilo (5 µg/kg/h) y bromuro de pancuronio (0.4 mg/kg/h).

Donante

El abordaje se realizó por esternotomía media. Se abrieron ambas pleuras y el pericardio. Se disecaron ambas cavas superior e inferior, y se colocaron ligaduras alrededor de ambas venas cavas. Se individualizaron la aorta ascendente y el tronco de la arteria pulmonar. Tras anticoagular al animal con heparina sódica (3mg/kg i.v.), ligar las cavas y ocluir la aorta antes de la salida de los troncos supraaórticos, se inició la infusión de solución cardiopléjica a 4°C por aorta ascendente, seccionando la cava inferior para drenar el corazón derecho y el seno coronario. Una vez parado el corazón, se inició la perfusión pulmonar retrógrada, desde la orejuela izquierda, con solución de la Universidad de Wisconsin (Viaspan® Bristol-Myers S.A. Madrid, España), 50 ml/kg, a una presión no superior a 30 cmH₂O y temperatura de 4°C. El enfriamiento se completó irrigando suero salino a 4°C sobre mediastino y ambos hemitórax. Para la extracción del bloque cardiopulmonar se seccionaron los ligamentos pulmonares inferiores, se abrió la pleura mediastínica y se despegó el esófago. Se seccionaron la aorta, al inicio de su tramo descendente, y los troncos supraaórticos. Se disecó la tráquea, se ocluyó a unos 6-8 cm de la carina durante una inspiración, a fin de mantener los pulmones insuflados, y tras seccionarla se extrajo la pieza. Esta se introdujo en un contenedor con suero salino a 4°C y se mantuvo en nevera 22 h hasta el momento de la implantación. La elección de las 22 horas de isquemia se realizó para asegurar que la gran mayoría de los pulmones transplantados sufrieran daño por isquemia-reperfusión, que se agrava con el tiempo de isquemia.

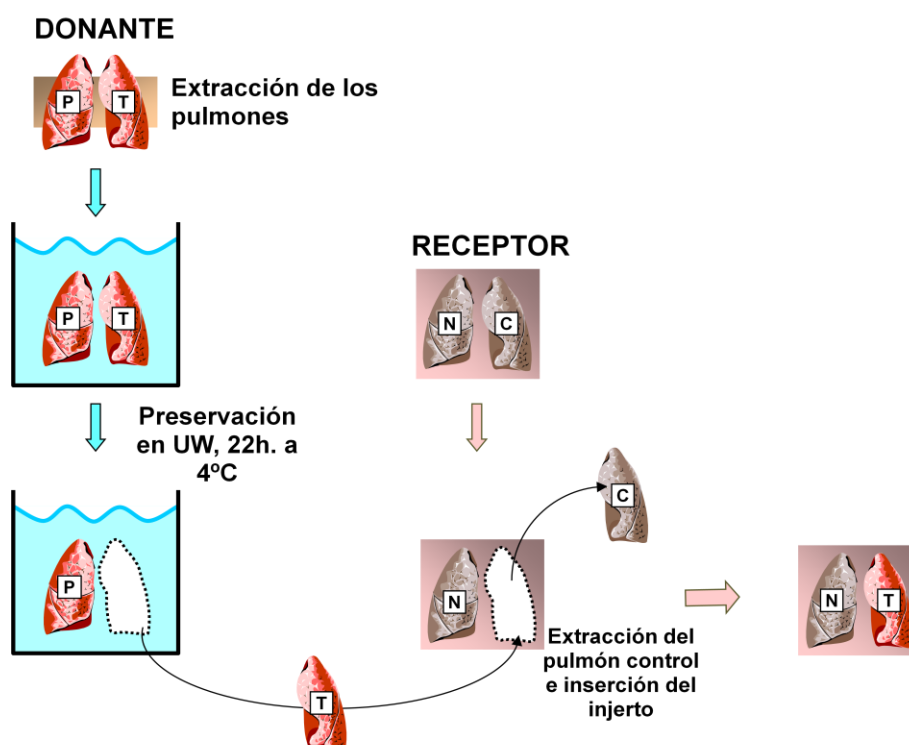


Figura 1: Esquema del proceso de transplante de pulmón izquierdo. P: pulmón preservado, T: pulmón transplantado, C: pulmón control, N: pulmón nativo; UW: universidad de Wisconsin.

Receptor

Para poder extraer el pulmón izquierdo, el receptor se sometió a una toracotomía posterolateral izquierda a través del quinto espacio intercostal. Se ligó y cortó la vena hemiacigos y se abrió el pericardio por la zona anterior a las venas pulmonares. Los muñones anastomóticos, necesarios para el implante posterior del pulmón proveniente del donante, se prepararon después de los pinzamientos de la arteria pulmonar izquierda en el punto de su bifurcación y del bronquio izquierdo principal. Por último, la orejuela izquierda del corazón se clampó lateralmente. Se extrajo entonces el pulmón izquierdo, que es el que se usó como pulmón control. Seguidamente se procedió a la anastomosis del pulmón izquierdo del donante en el receptor. La anastomosis de la vía aérea se realizó con una sutura simple de Prolene 4-0 y la de cada vía vascular con una 5-0. Con la retirada de las pinzas de oclusión de la aurícula y del bronquio concluyó el transplante. Dos horas después del comienzo de la reperfusión, los animales se sacrificaron mediante la administración intravenosa de KCl y se extrajeron ambos pulmones para su estudio.

3.4. Instilación de FK506 liposomal, liposomas o suero salino

L-FK506, liposomas sin tacrolimus, o suero salino fueron instilados en el pulmón izquierdo del donante antes de la extracción de los pulmones en los grupos L-FK, Lip, NT, respectivamente. La instilación se realizó a 37 °C, estando siempre los animales ventilados. L-FK506 se instiló a una dosis de 0.2 mg de FK506/kg peso (25 mg fosfolípido/2.5 ml/kg; 8×10^{-3} mg FK506/mg fosfolípido). Los liposomas se instilaron a una dosis de 25 mg fosfolípidos/2.5 ml/kg, y se instiló el mismo volumen de suero salino (2.5 ml/kg) en el grupo no tratado (Tabla 1).

GRUPOS	Tiempo de isquemia	Animales (≈ 20 kg)	dosis PL (mg PL/kg)	Vol. instilado	[PL] (mg/ml)	dosis L-FK506
NO TRATADOS	22 h	6D + 6R	-	2.5 ml suero	-	-
TRATADOS CON L-FK506 (0.2 mg/kg)	22 h	6D + 6R	25	2.5 ml L-FK506	10	0.2 mg L-FK506/kg)
TRATADOS CON LIPOSOMAS	22 h	6D + 6R	25	2.5 ml liposomas	10	-

Tabla 1: Resumen de las dosis utilizadas en los distintos grupos experimentales. PL: fosfolípidos; D: donante; R: receptor

3.5. Grupos de pulmones estudiados

Los pulmones utilizados para el estudio fueron (Figura 2):

1. CONTROL: pulmón control, que es el pulmón izquierdo del receptor.
2. TRASPLANTADO: que es el pulmón izquierdo del donante mantenido 22 horas en la solución preservadora e implantado en el receptor. Este grupo se divide a su vez en tres subgrupos en función del tratamiento:
 - 2.1. TX-NT: Pulmones transplantados no tratados.
 - 2.2. TX-L-FK: Pulmones transplantados tratados con L-FK506.
 - 2.3. TX-Lip: Pulmones transplantados tratados con liposomas.

3. **PRESERVADOS:** Pulmón derecho del donante que permanece 22 horas en líquido de preservación
4. **NATIVOS:** Pulmón derecho del receptor (Figura 3), tratado con L-FK506 y tratado con liposomas

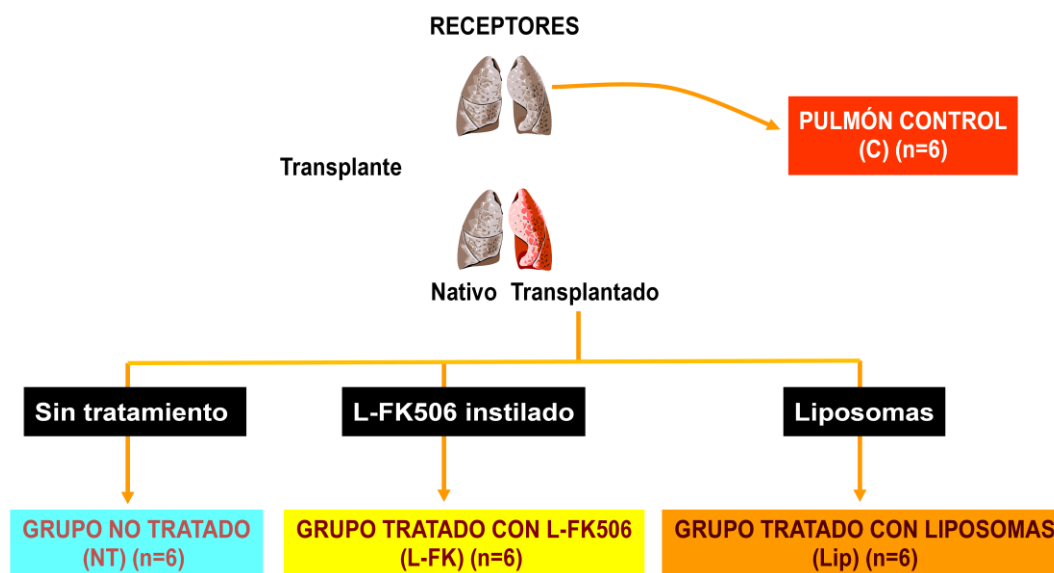


Figura 2: Grupos de pulmones estudiados.

3.6. Parámetros cardiovasculares y hemodinámicos

En los tres grupos de animales se realizaron las determinaciones que se detallan a continuación. En situación basal se recogieron los datos correspondientes al donante y al receptor con ambos pulmones. Tras la realización del transplante, se procedió a realizar las mismas determinaciones al inicio de la perfusión ($t = 0$) y transcurridas 1 y 2 horas, con ambos pulmones.

La frecuencia cardíaca (**FC**), el **ECG** (derivación II), la presión arterial sistémica (sistólica, diastólica y media (**PAm**)), la presión de arteria pulmonar (sistólica, diastólica y media (**APm**)), la presión capilar pulmonar (**PCP**) y la presión venosa central se recogieron en un equipo para monitorización cardiovascular PM8060 Vitara (Dräger Hispania. Madrid, España). El gasto cardíaco (**CO**) se midió por termodilución en un monitor SAT-2TM (Baxter Healthcare Corporation). Las resistencias vasculares pulmonares (**RVP**) se calcularon según la fórmula siguiente:

$$\text{RVP} = 80 (\text{APm-PCP}) / \text{GC}$$

La **FC** se midió en latidos por minuto (lpm), las **presiones** en mmHg, el **GC** en L/min y las **RVP** en dinas/s/cm-5.

3.7. Parámetros gasométricos y ventilatorios

Se midieron las presiones parciales de O₂ y CO₂ y la saturación de O₂ en muestras de sangre heparinizada arterial y venosa mixta (**PaO₂**, **PvO₂**, **PaCO₂**, **PvCO₂**, **SataO₂** y **SatvO₂**, respectivamente) utilizando un analizador de gases en sangre 1300 pH/Blood Gas Analyzer (Instrumentation Laboratory. Milano, Italia). A partir de ellos se calcularon los siguientes parámetros de oxigenación derivados: presión alveolar de O₂ (**PAO₂**), contenido de O₂, arterial, venoso mixto y capilar (**CaO₂**, **CvO₂**, **CcO₂**, respectivamente) y shunt intrapulmonar (**Qs/Qt**), según las fórmulas:

$$PAO_2 = (PB - PH_2O) - PACO_2$$

$$CaO_2 = (1,39 \times Hb \times SataO_2) + (PaO_2 \times 0.0031)$$

$$CvO_2 = (1,39 \times Hb \times SatvO_2) + (PvO_2 \times 0.0031)$$

$$CcO_2 = (1,39 \times Hb) + (PaO_2 \times 0.0031)$$

$$Qs/Qt = (PAO_2 - PaO_2) \times 0,0031 / [(PAO_2 - PaO_2) \times 0,0031 + (CaO_2 - CvO_2)] \times 100$$

PB: Presión barométrica; en Madrid promedio de 707 mmHg.

PH₂O: Presión de vapor de agua en el aire alveolar = 47 mmHg.

PACO₂: Presión alveolar de CO₂, equivalente a la PaCO₂].

La resistencia dinámica espiratoria (**Rexp**) y las distensibilidades estática (**Cest**) y dinámica (**Cdyn**) fueron calculadas por el ventilador.

Las PaO₂, PvO₂, PaCO₂, PvCO₂ y PAO₂ se midieron en mmHg, las SataO₂, SatvO₂ y el Qs/Qt en %, la Rexp en cmH₂O/L/s, y las Cdyn y Cest en ml/cmH₂O.

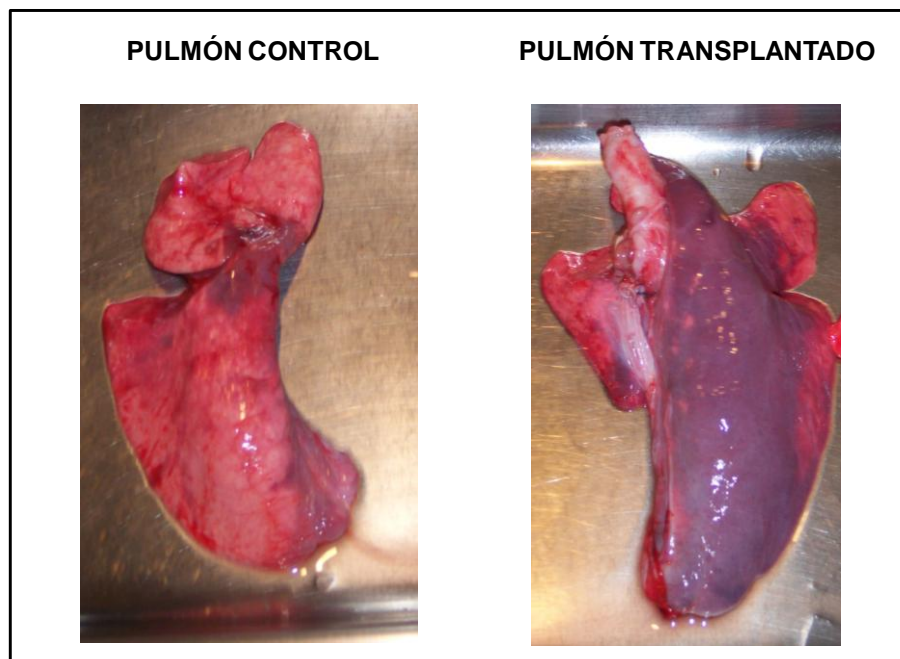


Figura 3: Aspecto de un pulmón control y un pulmón transplantado del grupo no tratado

3.8. Procesamiento del lavado broncoalveolar

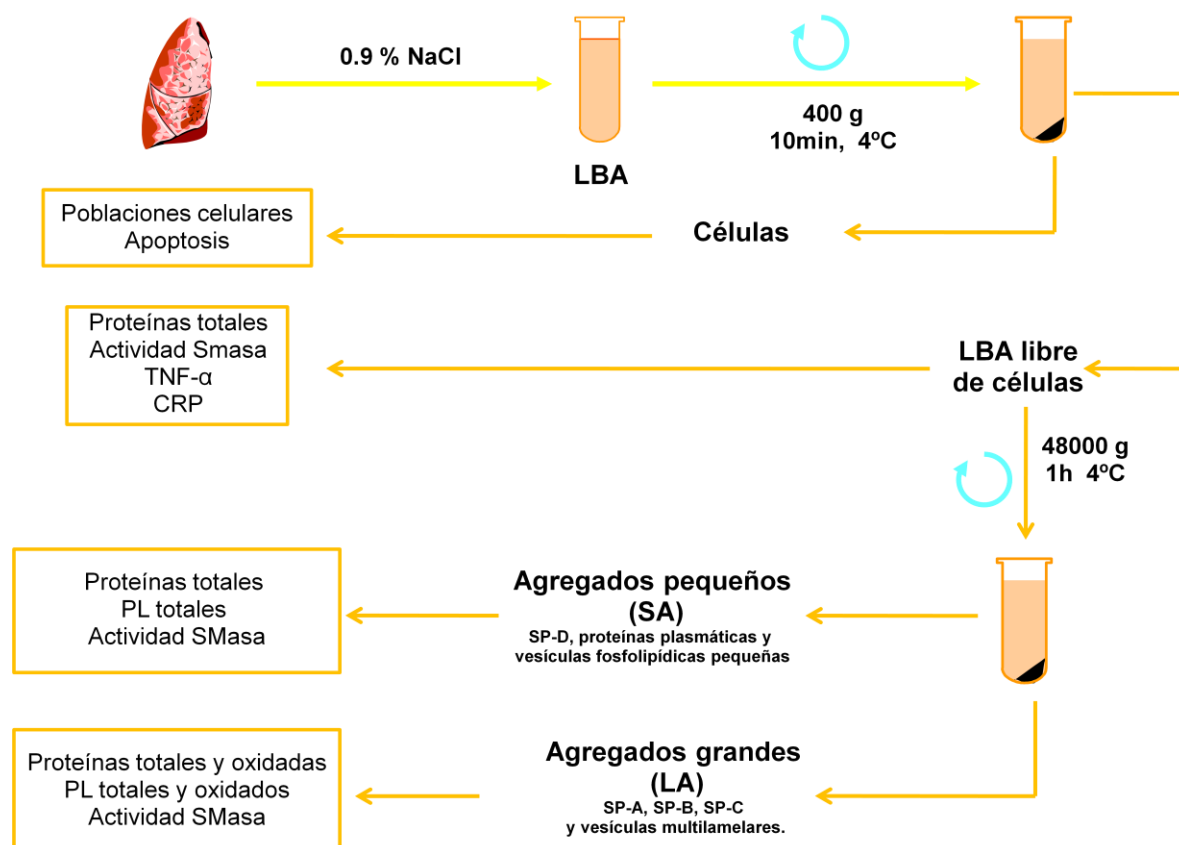


Figura 4: Procesamiento del lavado broncoalveolar

Cada pulmón se lavó con 1 litro de suero salino a 4 °C tal y como se describe en (Casals *et al.* 1989). Se recogieron aproximadamente 800 ml de lavado broncoalveolar (LBA), que fueron inmediatamente centrifugados a 400 g durante 10 minutos a 4 °C para obtener las células. El LBA libre de células se utilizó para la determinación de proteínas y marcadores inflamatorios, y para el aislamiento de las fracciones del surfactante (Figura 4).

3.9. Cuantificación de tacrolimus en sangre arterial y lavado broncoalveolar

La determinación de los niveles de tacrolimus en sangre arterial y LBA se realizó mediante MEIA con un analizador Abbott IMx (Abbott Park, IL). La cuantificación de los niveles de tacrolimus en la sangre arterial del receptor se realizó en una situación basal (previa a la operación) y tras la realización del trasplante a las 0, 1 y 2 horas de la reperusión.

3.10. Ensayos citométricos a partir del precipitado celular del lavado broncoalveolar

Todos los experimentos se realizaron usando un citómetro de flujo de fluorescencia (FACSort, Becton-Dickinson, New Jersey, USA). Las células se lavaron 2 veces con suero salino frío y se resuspendieron en un volumen final de 5 ml. Esta suspensión celular fue la que se usó para los análisis de las poblaciones celulares de macrófagos alveolares, neutrófilos y linfocitos por tamaño/complejidad. También se determinó el número de células totales en el LBA por conteo en cámara de Neubauer (Marienfeld, Germany), comprobando la viabilidad celular por exclusión de las células teñidas con azul tripán.

Por otra parte, los linfocitos se aislaron del precipitado celular mediante una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) (400 g, 20 minutos) a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con suero salino frío para eliminar los restos de Ficoll y se contaron usando una cámara de Neubauer para ajustar la concentración celular a 10^6 células/ml. Posteriormente se fijaron en PBS/etanol al 70 % y se guardaron a 4 °C toda la noche. Para medir la muerte celular las células fueron tratadas con RNAsa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) e incubadas con yoduro

de propidio, que se intercalará entre las cadenas de DNA. El porcentaje de células apoptóticas se analizó por FACS.

Para los análisis de las distintas subpoblaciones linfocitarias: T (citotóxicos [T_C] y colaboradores [T_H]), B y células NK, se añadió a la suspensión celular anticuerpos monoclonales marcados con sondas fluorescentes que se unen específicamente a un determinado marcador de la superficie celular, y se analizó por FACS. Las células se incubaron con diferentes anticuerpos monoclonales de la siguiente manera:

- Marcaje de antígenos CD3/CD8, para la identificación de los linfocitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) y células NK (CD3-/CD8+). Para ello se utilizaron dos anticuerpos: el mouse antipig CD3 ϵ acoplado a isotiocianato de fluoresceína (Becton Dickinson, New Jersey, USA), que reacciona con una cadena de 25 KDa que forma parte del complejo asociado al receptor CD3, presente en todos los linfocitos T; y el mouse antipig CD8 α acoplado a R-ficoeritrina (Becton Dickinson, New Jersey, USA), que reacciona con un antígeno de 35 KDa de la cadena CD8 α , expresado en linfocitos T citotóxicos y células NK.
- Marcaje de antígenos CD3/CD4, para la identificación de los linfocitos T helper. Para ello se utilizaron dos anticuerpos: el mouse antipig CD3 ϵ acoplado a isotiocianato de fluoresceína y el mouse antipig CD4 α acoplado a R-ficoeritrina (Becton Dickinson, New Jersey, USA), que reacciona con un antígeno de 55 KDa de la cadena CD4 α , expresado en linfocitos T helper.
- Marcaje de antígenos SLA-DR y SWC3a, para la identificación de los linfocitos B y linfocitos T activados y de los macrófagos. Para ello se utilizaron tres anticuerpos: el mouse anti SLA-DR (Becton Dickinson, New Jersey, USA), que reacciona con el antígeno de leucocitos porcino DR expresado en linfocitos B y linfocitos T activados, con el goat antimouse Ig acoplado a R-ficoeritrina (Becton Dickinson, New Jersey, USA) como anticuerpo secundario; y el antiSWC3a acoplado a isotiocianato de fluoresceína (Southern Biotech, Birmingham, USA), que reacciona con más del 90 % de monocitos y granulocitos porcinos y con menos del 5 % de linfocitos.

Una vez realizada la incubación con los distintos anticuerpos, las células se lavaron con suero salino frío y se trataron con la solución de lisis FACS (Becton Dickinson, New

Jersey, USA) durante 10 minutos para la eliminación de los eritrocitos (que pueden dar problemas en los análisis de los linfocitos porque muestran características de dispersión de luz similares), seguida de una centrifugación para la eliminación del sobrenadante. Tras otro lavado con suero salino frío, el pellet se resuspendió en PBS con paraformaldehído al 2 %, que mantiene los anticuerpos fijados a las células y evita la pérdida de los fluoróforos. Finalmente, las células se pasaron por el citómetro de flujo con un conteo de unos 10000 eventos totales por tubo y se obtuvieron los dot blot correspondientes.

3.11. Aislamiento de los agregados del surfactante (grandes y pequeños)

El LBA libre de células se centrifugó durante 1 hora a 48000 g en una ultracentrífuga (Beckman Coulter, Fullerton, USA) para obtener un precipitado que corresponde a los agregados grandes (large aggregates, LA) o forma activa del surfactante pulmonar (Veldhuizen *et al.* 1993). Los LA están formados por vesículas multilamelares de fosfolípidos y las apolipoproteínas SP-A, SP-B y SP-C específicas del surfactante. Los precipitados se homogenizaron en potter con NaCl al 0.9 %. Los agregados pequeños (small aggregates, SA) son vesículas unilamelares pequeñas que no precipitan durante la ultracentrifugación y permanecen en el sobrenadante. Estas vesículas carecen de actividad biofísica del surfactante. En la fracción SA, además de las vesículas unilamelares pequeñas, se encuentra la proteína soluble SP-D del surfactante y proteínas séricas no específicas del surfactante,

3.12. Extracción lipídica

Para analizar el contenido lipídico de las fracciones LA y SA se realizaron extracciones lipídicas con disolventes orgánicos, según el método de Bligh y Dyer (Bligh and Dyer 1959). Para ello se descongelaron alícuotas de 1 ml que se trasvasaron a tubos previamente deslipidizados mediante lavado con $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1, v/v). Tras añadir 1 ml de CHCl_3 y 2 ml de CH_3OH , las mezclas $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2:1, v/v) se agitaron vigorosamente al menos durante 30 segundos. Con este tratamiento se mantiene un sistema monofásico. Tras incubar los tubos tapados durante 30 minutos a 37 °C en un baño Unitronic 320 OR con agitación continua para producir la floculación de proteínas, se añadieron 1 ml de cloroformo y 1 ml de H_2O , de tal manera que, tras agitar las mezclas $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1) durante 30 segundos y centrifugar a 3000

rpm durante 5 minutos, se estableció un sistema bifásico. Tras separar la fase orgánica de cada uno de los tubos y trasvasarla a tubos previamente deslipidizados, se añadieron 2 ml de cloroformo a la fase acuosa remanente.. Después de agitar y centrifugar como acaba de explicarse, se procedió a la extracción de la correspondiente fase orgánica. Este proceso de lavado de la fase acuosa con cloroformo y extracción de la fase orgánica resultante se repitió una vez más, con el fin de recuperar la mayor cantidad posible de material hidrofóbico.

Las fases orgánicas reunidas de cada una de las muestras en tubos B19 se llevaron entonces a un rotavapor Büchi para evaporar el disolvente. Una vez desecadas, las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.13. Cuantificación de proteínas totales

El contenido en proteínas totales se determinó tanto en LBA como en LA y SA a partir de una reacción colorimétrica basada en una modificación del método de Lowry (Lowry *et al.* 1951). Para ello se construyó una recta patrón entre 0 y 50 μg de albúmina en presencia de 60 μl de SDS y con un volumen final de 200 μl y se prepararon en paralelo los tubos con un volumen determinado de cada una de las muestras. Tras la adición de 1 ml de la mezcla tartrato sódico/ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ / Na_2CO_3 / NaOH (Merck, Darmstadt, Germany), los tubos se agitaron y se incubaron durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron 100 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany) en cada tubo, se agitaron y se incubaron durante 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, USA), usando para ello cubetas de 1 cm de paso óptico.

3.14. Cuantificación de fosfolípidos totales

La determinación de la cantidad de fosfolípidos (PL) totales se realizó mediante valoración de fósforo según el método descrito por Rouser y col. (Rouser *et al.* 1966). La recta de interpolación se construyó tomando volúmenes diferentes de una solución KH_2PO_4 0.05 mg/ml. Tras tomar por duplicado dos volúmenes diferentes de cada muestra y de un patrón de fosfolípido, se evaporaron los disolventes orgánicos en que se encuentran rigurosamente antes de la adición de los reactivos de mineralización de fósforo. Para conseguir la mineralización del fósforo contenido en los PL, se añadieron a cada tubo 0.45 ml de HClO_4 70% y se incubaron tapados con ampollas de cristal en un

baño de arena a 260°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo a temperatura ambiente. Tras la hidrólisis, el fósforo liberado se cuantificó mediante una reacción colorimétrica, añadiendo a cada tubo 3.5 ml de H₂O, 0.5 ml de molibdato amónico 2.5% p/v y 0.5 ml de ácido ascórbico 10% p/v (el molibdato forma un complejo con el fósforo que es reducido por el ácido ascórbico y forma a su vez un compuesto coloreado). La reacción se llevó a cabo durante 7 minutos en agua hirviendo y se detuvo por inmersión de los tubos en hielo. La cantidad de fósforo se determinó midiendo las absorbancias de los compuestos coloreados a 820 nm en un espectrofotómetro DU.800 (Beckman Coulter, Fullerton, USA).

3.15. Cuantificación de la proteína C reactiva

La cuantificación de la proteína C reactiva (CRP) se realizó a partir del LBA mediante un ELISA (GenWay Biotech, Inc. San Diego, USA). En este ensayo la CRP presente en el LBA se unió a un anticuerpo específico anti-CRP de cerdo unido a los pocillos de la placa de poliestireno. Tras un lavado con PBS/Tween-20 al 0.5 % (v/v) para eliminar todas las proteínas del LBA no unidas a la placa, ésta se incubó con un anticuerpo anti-CRP acoplado a peroxidasa, que se unirá a la CRP previamente unida a los anticuerpos pegados a la placa. Finalmente, y tras otra etapa de lavado, la enzima se detectó por revelado con 3,3',5,5',tetrametilbencidina (TMB) y, tras la parada de la reacción con H₂SO₄, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA DIGISCAN (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

3.16. Cuantificación de TNF- α

La cuantificación de la citoquina proinflamatoria TNF- α se realizó mediante un ELISA a partir del LBA (Pierce Endogen, Rockford, IL). En primer lugar se unió un anticuerpo anti-TNF- α de cerdo a los pocillos de una placa de poliestireno (Maxisorp®, Nunc, Rochester, NY) y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Tras una etapa de lavado con PBS/Tween-20 0.05 % (v/v) la placa se bloqueó con PBS/suero bovino fetal 10 % (v/v) para evitar las uniones inespecíficas y se incubó con las distintas muestras donde está presente el TNF- α que se unirá al anticuerpo. Tras otra etapa de lavado para eliminar las proteínas no unidas, la placa se incubó con un segundo anticuerpo anti-TNF- α que se encuentra biotinilado, y con el reactivo estreptavidina peroxidasa que se unirá al anticuerpo biotinilado. Tras un último lavado para eliminar el anticuerpo no unido, se procedió al revelado de la enzima con TMB y una vez parada la reacción con H₂SO₄, se

leyó la absorbancia de la placa a 450 nm en un lector de placas de ELISA DIGISCAN (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

3.17. Cuantificación de lípidos oxidados

La cuantificación de los lípidos del surfactante oxidados se realizó a partir de los extractos orgánicos de los LA mediante un ensayo de hidroperoxidación lipídica (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). El método consiste en una determinación de los hidroperóxidos de los lípidos de la muestra usando reacciones redox con iones de hierro. Los hidroperóxidos reaccionan rápidamente con iones Fe^{2+} para producir iones Fe^{3+} , que son detectados usando el ión tiocianato como cromógeno. Se diseñó una curva patrón con un estándar de ácido 13-hidroperoxi-octadecadienoico en un intervalo de entre 0 y 50 nmoles. En paralelo, se prepararon las muestras con los volúmenes correspondientes de los extractos orgánicos, y todos los tubos se incubaron tapados con los reactivos sulfato ferroso en HCl 0.2 M y tiocianato de amonio en metanol al 3 % (v/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, USA), usando para ello cubetas de 1 cm de paso óptico.

3.18. Cuantificación de proteínas oxidadas

La oxidación de las proteínas presentes en el LBA y en el LA se estimó a partir de su contenido en carbonilos mediante un ensayo de unión a 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) (Martin *et al.* 2007). DNPH reacciona con los carbonilos de las proteínas formando una base de Schiff para producir la consiguiente hidrazona, que podrá ser analizada espectrofotométricamente.

Las muestras se incubaron con DNPH 10mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en HCl 2M durante 1 hora agitando cada 15 minutos. A continuación las proteínas se precipitaron por incubación en hielo con ácido tricloroacético (TCA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) durante 5 minutos. Tras centrifugar las muestras a 10000 g, 10 minutos y a 4 °C, el pellet se lavó dos veces con etanol/etilacetato (1:1 v/v) y las proteínas se solubilizaron en hidrocloreuro de guanidinio 8M (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland). Tras una última centrifugación a 16000 g durante 5 minutos y a 4 °C para eliminar las trazas de material insoluble, se midió la absorbancia a 370 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, USA), usando para ello cubetas de 1 cm de paso óptico.

3.19. Determinación de la actividad esfingomielinasa ácida

La presencia de la enzima esfingomielinasa (SMasa) en muestras de LA, SA y LBA se determinó mediante un ensayo de actividad enzimática a partir de un sustrato de esfingomielina (SM) radiactiva ([N-metil- ^{14}C]Esfingomielina, Amersham, UK) (50-62 mCi/mmol, 25 $\mu\text{Ci/ml}$), que por acción de la enzima dará como productos ceramida y fosfocolina, siendo en ésta última donde permanecerá el ^{14}C .

Para preparar el sustrato radiactivo se secaron 10 nmoles de SM fría y 0.15 nmoles de SM marcada radiactivamente (10.15 nmoles totales de sustrato, actividad específica de 0.74 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) y se hidrataron en un tampón acético/acetato 0.2 M (pH 5.0), Tritón X-100 0.5% (v/v) y cloruro de zinc 0.1 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a 45°C durante 1 hora y en agitación. Posteriormente se realizó el ensayo de actividad enzimática incubando el sustrato con las distintas muestras (volumen final 100 μl) a 37°C-38°C durante 120 minutos. Transcurrido el tiempo se añadieron 900 μl de cloroformo/metanol (2:1 v/v) para parar la reacción y realizar la extracción orgánica. Los tubos se agitaron vigorosamente, se añadieron 200 μl de agua (cloroformo/metanol/agua 2/1/1 v/v/v), se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos para facilitar la separación de fases. A continuación se recogieron 300 μl de la fase superior (conteniendo la fosfocolina marcada con el ^{14}C), y se añadieron a un vial con líquido de centelleo (MP Biomedicals, Irvine, CA) para el conteo de las cpm en un contador de centelleo durante 5 minutos/tubo.

3.20. Medidas de SP-A, SP-B y SP-C por Western blot

Las apolipoproteínas SP-A, SP-B y SP-C se detectaron a partir de los agregados grandes de surfactante pulmonar mediante un análisis por Western blot. En primer lugar, se realizó una electroforesis en condiciones reductoras (con 5 % de β -mercaptoetanol) en un PAGE-SDS unidimensional, siendo el gel concentrante del 4 % de acrilamida y el separador del 12 % para SP-A, del 16 % para SP-B y del 18 % para SP-C. Para el caso de la SP-A se cargó una cantidad similar de proteína total en todas las muestras y para SP-B y SP-C una cantidad similar de proteínas o de fosfolípidos. Tras la electroforesis las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en el caso de SP-A y SP-B y de difluoruro de polivinilo (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en el caso de SP-C. Para SP-B y SP-C la transferencia se llevó a cabo fijando el voltaje a 100 V. durante un tiempo equivalente

a un incremento de la intensidad de 100 mA. con un tampón de transferencia Tris-HCl 25 mM pH 7.4, glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v) para SP-B, y además con SDS al 0.01 % (p/v) para SP-C. Para la SP-A se realizó una transferencia en semiseco a 10 V. durante 30 minutos con un tampón de transferencia Tris-HCl 25 mM pH 7.4, glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v). Una vez realizada la transferencia la membrana se bloqueó con leche al 5 % (p/v) en PBS con Tween-20 al 0.1 % (v/v), y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario (anticuerpos policlonales anti SP-A, anti SP-B o anti SP-C desarrollados en conejo) durante 1 hora en PBS con Tween-20 al 0.1 % (v/v). Tras los lavados se incubó con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-rabbit Ig-G acoplado a peroxidasa, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 hora en PBS con Tween-20 al 0.1 % (v/v). Finalmente, y tras otra tanda de lavados, se llevó a cabo la visualización de las bandas por quimioluminiscencia, incubando la membrana un minuto en oscuridad con ECL (Millipore, Billerica, MA) y revelando en la máquina reveladora (Curix 60, Agfa, Mortsel, Belgium) la película correspondiente. La cuantificación se realizó mediante densitometrado de las bandas mediante el programa informático Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

3.21. Ensayos de adsorción interfacial

La actividad biofísica de las muestras se determinó midiendo su capacidad para adsorberse a una interfase aire-líquido y extenderse en ella como se describe en (Casals *et al.* 1998) (Valino *et al.* 2004) (Sanchez-Barbero *et al.* 2005) (Saenz *et al.* 2010). Se inyectaron la misma cantidad de fosfolípidos de todas las muestras en la subfase acuosa de una cubeta de teflón tipo King-Clements. La subfase estaba constituida por 6 ml de una solución NaCl 150 mM, HEPES 25 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6.9 y se sometió a agitación continua para evitar que la difusión fuera la etapa limitante del proceso de adsorción. La actividad biofísica se midió monitorizando los cambios en la tensión superficial (γ) de la interfase aire-líquido en función del tiempo, a través de una lámina de platino acoplada a una balanza de superficie (KSV Instruments).

Los cambios en γ medidos en la microbalanza permiten cuantificar a su vez los cambios en la presión superficial (π) en función del tiempo (π es un parámetro utilizado para representar la capacidad del surfactante pulmonar de adsorberse rápidamente a una interfase aire-líquido). La presión superficial π se relaciona con la tensión superficial γ mediante la expresión $\pi = \gamma^0 - \gamma$, donde γ^0 es la tensión superficial del líquido en la

interfase aire-líquido en ausencia de surfactante, y γ es la tensión superficial en presencia del surfactante. Aunque γ y π se expresan en las mismas unidades, varían en sentidos opuestos: cuando γ es alta, π es baja y viceversa. Por ejemplo, en ausencia de surfactante, π es 0 mN/m, puesto que $\gamma = \gamma^0 = 72$ mN/m, valor correspondiente a la tensión superficial del agua pura. En presencia de surfactante, los fosfolípidos forman una monocapa en la interfase aire-líquido excluyendo moléculas de agua, de manera que la presión superficial (π) aumenta y la tensión superficial (γ) disminuye. Cuando la interfase aire-líquido está saturada de fosfolípidos, la γ de equilibrio es 25 mN/m lo que se corresponde a una π de 47 mN/m ($\pi = \gamma^0 - \gamma = 72 - 25 = 47$ mN/m).

3.22. Análisis estadísticos

Todos los datos representan la media \pm desviación estándar de medidas concretas. Las medias estaban normalmente distribuidas (test de Shapiro-Wilk). Las diferencias en las medias de los distintos grupos de pulmones fueron valoradas por un análisis simple de la varianza (one- way ANOVA) seguido de un Bonferroni. Se consideró significativo un nivel de confianza del 95% o mayor. ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. Respuestas fisiológicas

La funcionalidad pulmonar se determinó a partir de medidas gasométricas, ventilatorias y hemodinámicas en animales receptores de los grupos no tratado, tratado con L-FK506 y tratado sólo con liposomas en el donante. Hay que destacar que en este caso los resultados no hacen referencia al pulmón transplantado sino a la función de los dos pulmones (nativo y transplantado), ya que el proceso de 22 horas de isquemia implica un daño significativo en los pulmones del animal que impide clampar el bronquio y la arteria pulmonar correspondientes al pulmón transplantado.

Como puede verse en la Figura 5, el transplante pulmonar produjo un deterioro significativo de la oxigenación arterial 2 horas después de la reperfusión en comparación con los valores basales, tanto en los animales no tratados como en los tratados sólo con liposomas. Los receptores del grupo de animales tratados con L-FK506 mostraron una oxigenación arterial normal, sin diferencias significativas entre el valor basal y los valores obtenidos a la primera y segunda hora después de la

reperfusión. Las diferencias de PaO_2 entre el grupo tratado con tacrolimus liposomal y el no tratado o tratado con liposomas fueron significativas a la primera y segunda hora de la reperfusión.

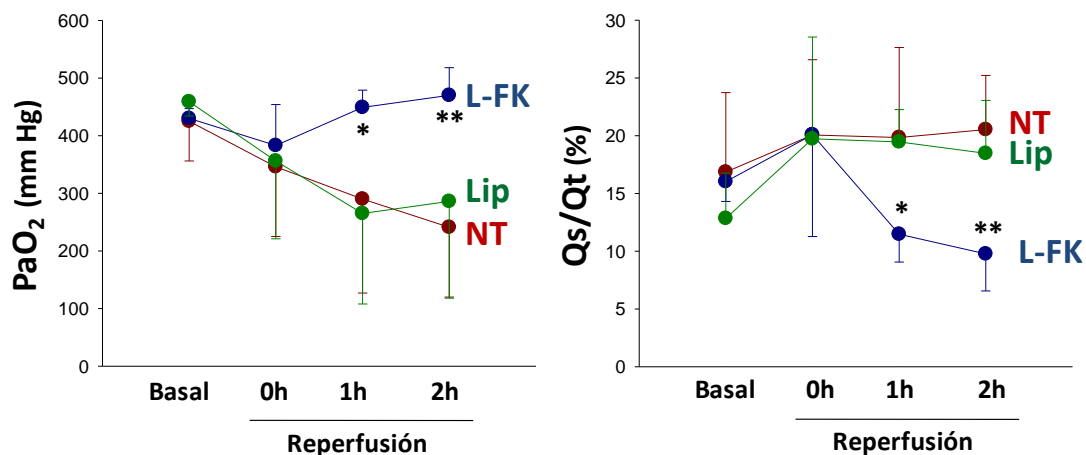


Figura 5: Valores de tensión arterial de oxígeno (PaO_2 , izquierda) y de shunt intrapulmonar (Q_s/Q_t , derecha) en receptores no tratados (NT), tratados con L-FK506 (L-FK) y tratados sólo con liposomas (Lip). Las medidas se realizaron en una situación basal (previa a la operación) y tras el trasplante de pulmón 0, 1 y 2 horas después de la reperfusión. * $p < 0.05$ vs NT y Lip. ** $p < 0.01$ vs NT y Lip.

El shunt intrapulmonar, que ocurre por la presencia en los pulmones de regiones perfundidas pero no ventiladas, se determinó para ver el grado de daño pulmonar. Éste se cuantifica mediante la ecuación shunt, que hace referencia a la cantidad de sangre venosa que no es oxigenada en los capilares pulmonares.

Tras el trasplante pulmonar se produce un aumento del shunt intrapulmonar tanto en los animales no tratados como en los tratados sólo con liposomas (Figura 5). Los animales tratados con L-FK506 presentaron una rápida recuperación del aumento producido al iniciarse la reperfusión, alcanzando valores similares a los basales ya en la primera hora de reperfusión.

No se encontraron diferencias significativas en el resto de parámetros gasométricos, ventilatorios y hemodinámicos entre los receptores no tratados y los tratados con L-FK506 o con liposomas (Tabla 2).

Peak P (cmH₂O)	Basal	0h	1h	2h
No tratado	19 ± 5	22 ± 3	25 ± 6	28 ± 8
L-FK506	19 ± 4	23 ± 5	24 ± 4	23 ± 3
Liposomas	18 ± 2	20 ± 4	24 ± 8	25 ± 9
Plateau P (cmH₂O)				
No tratado	14 ± 4	18 ± 2	20 ± 4	21 ± 4
L-FK506	14 ± 2	19 ± 4	20 ± 2	20 ± 3
Liposomas	14 ± 3	15 ± 3	19 ± 5	19 ± 6
Rexp (cmH₂O/L/s)				
No tratado	19,7 ± 3,6	20,2 ± 1,9	23,8 ± 8,8	23,5 ± 5,9
L-FK506	19,0 ± 3,7	21,6 ± 5,4	21,5 ± 2,6	20,7 ± 2,1
Liposomas	20,7 ± 2,8	22,0 ± 3,5	27,2 ± 13,0	25,0 ± 8,6
Cdyn (ml/cmH₂O)				
No tratado	21,7 ± 8,1	16,5 ± 3,5	14,8 ± 3,7	14,3 ± 5,0
L-FK506	24,7 ± 6,2	18,5 ± 5,3	17,0 ± 3,2	17,5 ± 4,3
Liposomas	23,5 ± 4,9	22,5 ± 10,3	20,3 ± 8,6	19,7 ± 9,3
mAP (mmHg)				
No tratado	87 ± 15	84 ± 20	81 ± 22	72 ± 28
L-FK506	104 ± 18	85 ± 15	87 ± 17	75 ± 12
Liposomas	99 ± 28	84 ± 8	78 ± 17	78 ± 23
CO (L/min)				
No tratado	2,4 ± 0,6	2,1 ± 0,5	1,7 ± 0,6	1,6 ± 0,6
L-FK506	2,8 ± 0,6	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,6
Liposomas	2,4 ± 0,4	2,7 ± 0,5	2,2 ± 0,7	2,1 ± 0,4
mPAP (mmHg)				
No tratado	18 ± 7	21 ± 7	21 ± 9	22 ± 9
L-FK506	15 ± 3	18 ± 3	20 ± 1	19 ± 2
Liposomas	18 ± 4	23 ± 6	22 ± 5	24 ± 10
PVR (dyne/s/cm⁻⁵)				
No tratado	513 ± 332	655 ± 447	820 ± 609	888 ± 657
L-FK506	277 ± 68	431 ± 109	542 ± 90	470 ± 242
Liposomas	348 ± 56	493 ± 160	643 ± 305	702 ± 439

Tabla 2: Parámetros gasométricos, ventilatorios y hemodinámicos en receptores no tratados, tratados con L-FK506 y tratados sólo con liposomas. Peak P: presión pico; Plateau P: presión en el plató; R exp: resistencia espiratoria; Cdyn: complianza dinámica; mAP: presión arterial media; CO: gasto cardíaco; mPAP: presión media de la arteria pulmonar; PVR: resistencia vascular pulmonar. Las medidas se realizaron en una situación basal (prequirúrgica) y tras el trasplante de pulmón 0, 1 y 2 horas después de la reperusión.

Con estos datos se puede concluir que el tratamiento con L-FK506, pero no con liposomas, conduce a una mejora significativa de la oxigenación arterial de los receptores.

4.2. Incorporación de L-FK506 instilado en la sangre arterial y el LBA de los animales receptores

Se cuantificó la cantidad de tacrolimus presente en la sangre arterial del animal receptor durante las 2 horas de reperusión y en el lavado broncoalveolar del pulmón transplantado tras la extracción de los pulmones.

Los datos presentados en la Figura 6 indican que, tras el transplante de pulmón, parte de L-FK506 instilado que reside en el pulmón donante pasó inmediatamente a la circulación sistémica apreciándose una disminución gradual en la concentración de FK506 en plasma a lo largo de las 2 horas de reperfusión, probablemente debido a la metabolización del fármaco. Tras las 2 horas de reperfusión la concentración de FK506 remanente en el lavado broncoalveolar del pulmón transplantado fue de 41 ± 14 ng/ml, valor dos veces superior al que aparece en plasma (20 ± 4 ng/ml).

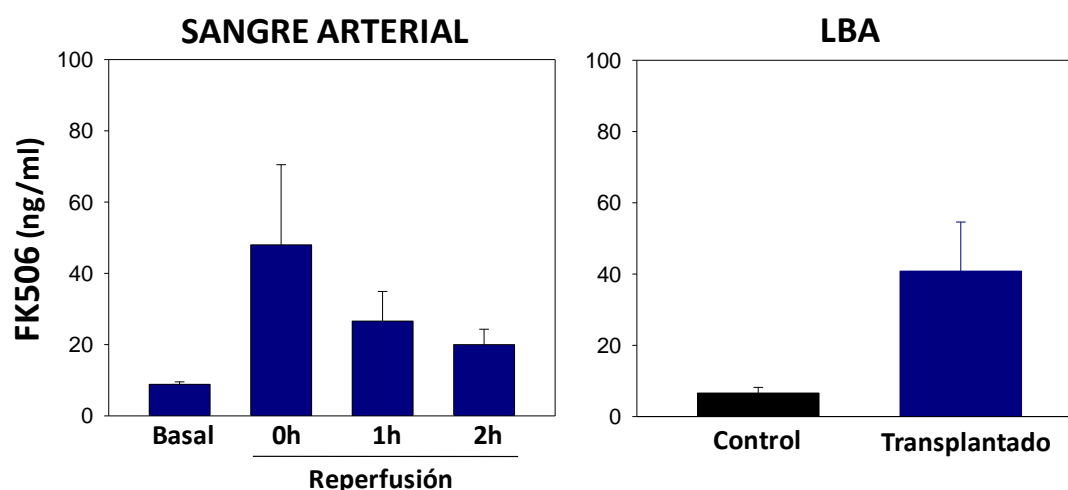


Figura 6: (izquierda): Niveles de tacrolimus en sangre arterial de los receptores tratados con L-FK506. Las medidas se realizaron en una situación basal (prequirúrgica) y tras el transplante de pulmón 0, 1 y 2 horas después de la reperfusión. (derecha): Niveles de tacrolimus en LBA aislado de pulmones control y transplantado tratado con L-FK506.

4.3. Marcadores de daño alveolar

4.3.1. Alteraciones celulares

El número total de células recuperadas en el LBA no fue significativamente distinto en pulmones control y transplantado, pero las subpoblaciones celulares cambiaron significativamente entre unos grupos y otros. Como puede verse en la Figura 7, la población de células mayoritarias presente en el LBA de los pulmones control son los macrófagos alveolares, siendo el porcentaje de neutrófilos muy reducido. En pulmones transplantados de los grupos tanto no tratado como tratado con liposomas la situación se invirtió, produciéndose un marcado aumento en el porcentaje de neutrófilos y una disminución en el porcentaje de macrófagos, mientras que el porcentaje de linfocitos no varió de forma significativa. Estos resultados son consistentes con el hecho de que el daño por isquemia-reperfusión es un proceso inflamatorio que se caracteriza por una

activación temprana de los macrófagos alveolares que liberan distintos mediadores inflamatorios responsables del reclutamiento de neutrófilos provenientes del torrente sanguíneo y que son los principales responsables de la perpetuación de la inflamación. Es importante señalar que el tratamiento con L-FK506, pero no sólo con liposomas, normalizó esta situación, obteniéndose unos porcentajes en los pulmones transplantados del grupo tratado con L-FK506 cercanos a los de los pulmones control.

Cuando los linfocitos se aislaron mediante gradiente de densidad con Ficoll contenido total de células fue mayor en pulmones transplantados del grupo no tratado que en pulmones control y pulmones transplantados tratados con L-FK506 o con liposomas. Sin embargo, el porcentaje de apoptosis en el grupo no tratado fue significativamente mayor que en los otros grupos (Figura 8). Estos datos indican que los liposomas y el tacrolimus liposomal tienen un efecto antiapoptótico sobre estas células.

Para investigar si las subpoblaciones de linfocitos se modifican en el transplante se analizaron el porcentaje de linfocitos T citotóxicos, linfocitos T helper, células NK y linfocitos B. Como se observa en la Tabla 3 no se encontraron variaciones significativas en las subpoblaciones de linfocitos entre los distintos grupos.

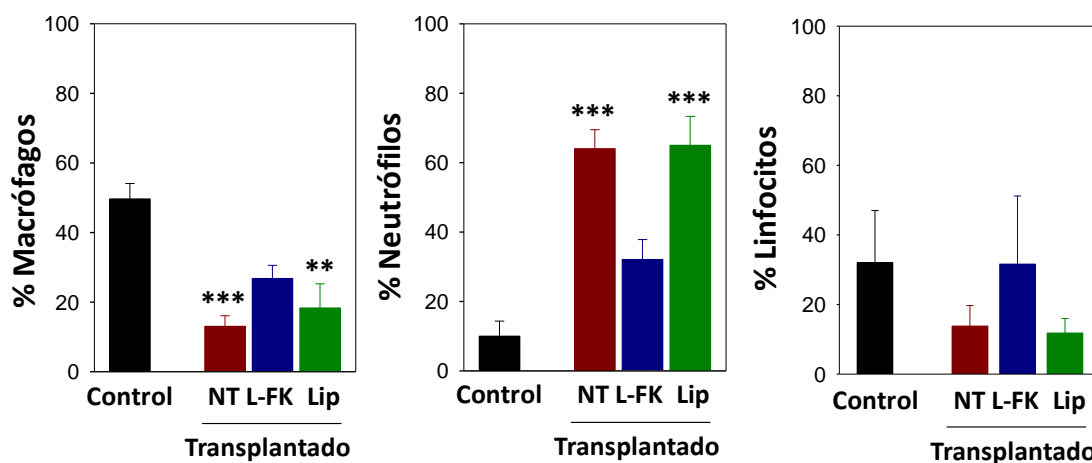


Figura 7: Porcentaje de macrófagos (izquierda) y neutrófilos (derecha) aislados a partir del LBA de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas. ** $p < 0.01$ vs Control. *** $p < 0.001$ vs Control.

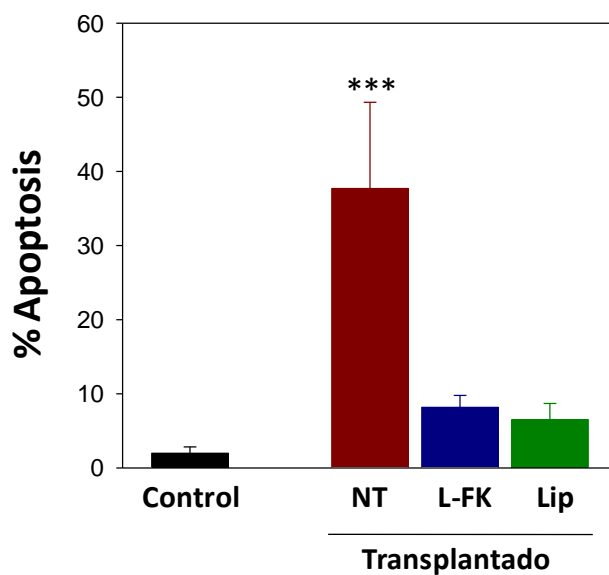


Figura 8: Porcentaje de apoptosis de linfocitos aislados a partir del LBA de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas (Lip). *** $p < 0.001$ vs Control.

	TRANSPLANTADO			
	Control	NT	L-FK506	Lip
% TCD8	75.8±8	73.3±9.5	67.1±10.6	62.7±14.5
% TCD4	18.7±6	20.6±2.6	16.5±4	18.2±3.8
% NK	3.1±1	5±2.6	3.9±2.3	3.7±2
% LB	11.2±9	7.5±9.2	16.5±10	19.1±16

Tabla 3: Porcentaje de las poblaciones linfocitarias: linfocitos T (LT), linfocitos T citotóxicos (TCD8), linfocitos T helper (TCD4), células NK (NK) y linfocitos B (LB) aislados a partir del LBA de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 y tratado sólo con liposomas (Lip).

4.3.2. Edema y oxidación de proteínas

El daño por isquemia-reperfusión produjo un marcado aumento en el contenido en proteína total aislada del LBA libre de células de pulmones transplantados no tratados y tratados con liposomas en comparación con los pulmones control o los pulmones transplantados tratados con L-FK506. Esto refleja la infiltración de las proteínas del

suelo al espacio alveolar debido al edema. El tratamiento con L-FK506 previno la formación del edema (Figura 9, izquierda). Además, el L-FK506 previno la oxidación de proteínas presentes en el lavado (Figura 9, derecha) que se encuentran significativamente carboniladas en el LBA de pulmones transplantados no tratados y tratados con liposomas como consecuencia del estrés oxidativo.

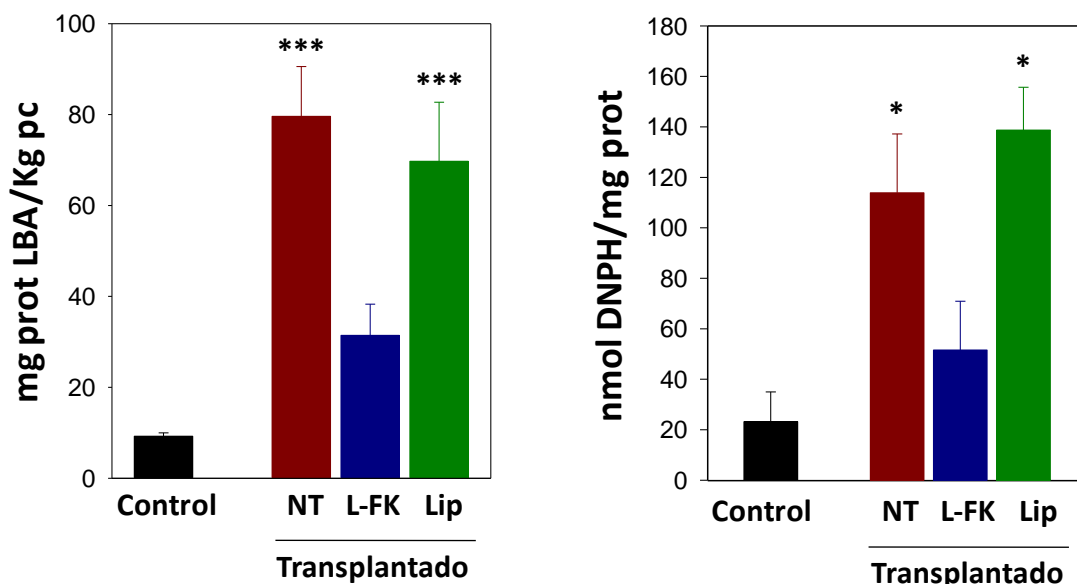


Figura 9: Edema en el fluido alveolar representado como contenido en proteína total (izquierda) y oxidación de dichas proteínas (derecha) en el LBA libre de células de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas (Lip). *p<0.05 vs Control. ***p<0.001 vs Control

4.3.3. Marcadores de inflamación

TNF- α es una citoquina proinflamatoria que juega un papel fundamental en los procesos inflamatorios, entre ellos en el daño por isquemia-reperfusión. La Figura 10 indica que los pulmones transplantados del grupo no tratado presentaron altos niveles de TNF- α en comparación con los pulmones control, mientras que los niveles en los pulmones transplantados de los grupos tratado con L-FK506 y con liposomas fueron similares a los del pulmón control, lo que refleja un efecto de los lípidos en lo que a este marcador se refiere.

La CRP es una de las proteínas plasmáticas que invaden el espacio alveolar como consecuencia de la alteración de la barrera alveolo-capilar. Además, puede ser secretada por los macrófagos alveolares. Es una de las proteínas que más contribuye a la inactivación de la función del surfactante pulmonar (Saenz *et al.* 2010). La Figura 10

muestra que en pulmones transplantados del grupo no tratado los niveles de CRP están significativamente aumentados con respecto a los de pulmones control. En los pulmones transplantados de los grupos tratado con L-FK506 y tratado con liposomas los niveles fueron similares a los de pulmones control, lo que vuelve a reflejar un efecto de los lípidos en lo que a este marcador se refiere.

Los resultados mostrados en la Figura 10 también demuestran que la actividad esfingomielinasa en el LBA se encontró significativamente aumentada en los pulmones transplantados de los grupos no tratado y tratado con liposomas con respecto a los pulmones control. Por el contrario, los valores encontrados en los pulmones transplantados del grupo tratado con L-FK506 fueron similares a los de los pulmones control.

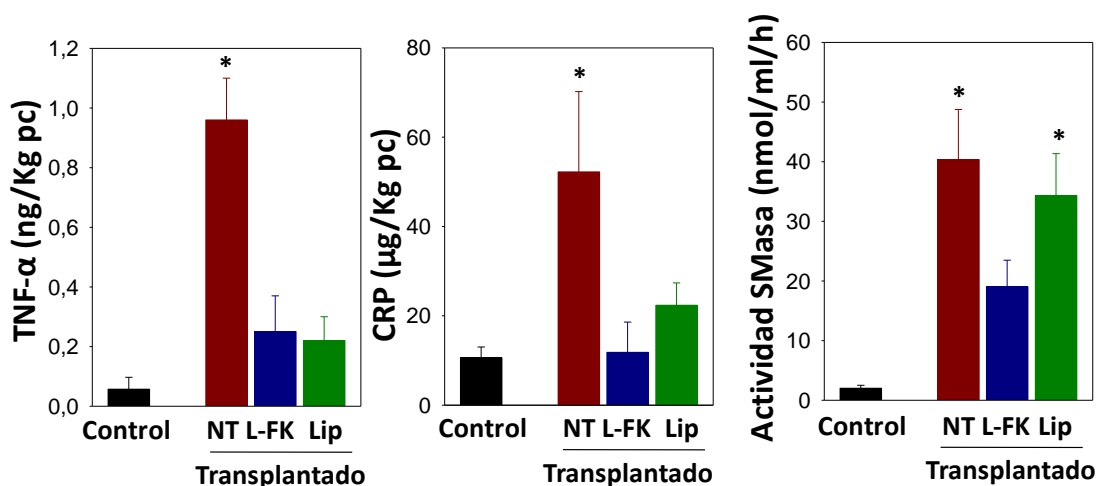


Figura 10: Niveles de TNF- α (izquierda) y proteína C reactiva (CRP) (centro) y actividad esfingomielinasa ácida (SMasa, representada como actividad específica en nmoles de producto/ml/h) (derecha) presente en el LBA libre de células de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas (Lip). * $p < 0.05$ vs Control.

Todos estos datos indican que el tratamiento con L-FK506 produce una disminución significativa del cuadro inflamatorio, reflejado en (i) disminución en el reclutamiento de neutrófilos; (ii) disminución en la apoptosis de linfocitos; (iii) prevención del edema; (iv) prevención de la oxidación de las proteínas del LBA; y (v) disminución de la secreción de TNF- α , CRP y esfingomielinasa ácida. El tratamiento sólo con liposomas en general no mejora esta situación, aunque sí algunos parámetros tales como la

apoptosis, CRP o TNF- α , lo que parece indicar un pequeño papel de los fosfolípidos en la disminución del contexto inflamatorio.

4.4. Propiedades bioquímicas y biofísicas del surfactante pulmonar

4.4.1. Composición del surfactante pulmonar

A partir del LBA se aislaron los agregados grandes (LA) y pequeños (SA) del surfactante pulmonar mediante ultracentrifugación diferencial. Los LA constituyen la fracción activa del surfactante secretada por los neumocitos tipo II mientras que los SA son la fracción inactiva compuesta por vesículas unilamelares formadas a partir del LA que son endocitadas por los macrófagos alveolares y neumocitos tipo II, cerrando el ciclo metabólico del surfactante. En situaciones patológicas se produce un aumento de la transformación de LA en SA que se piensa que es debida a la actuación de proteasas y posiblemente a la alteración de las membranas por el estrés oxidativo que tiene lugar en el contexto inflamatorio.

La Figura 11 muestra que la cantidad de fosfolípidos presentes en los LA de pulmones control es alrededor del doble que en los SA. Sin embargo, en los pulmones transplantados del grupo no tratado se produjo una elevada conversión de LA en SA, aumentando por tanto la relación SA/LA, siendo éste un importante marcador de daño alveolar. Los pulmones transplantados del grupo tratado con L-FK506 presentaron un marcado aumento de la cantidad de fosfolípidos, en ambas fracciones SA y LA, lo que indica que la preparación de tacrolimus liposomal alcanzó el espacio alveolar y que parte de ella fue eficientemente incorporada en la fracción activa del surfactante a pesar de que se instilan nanoliposomas. La relación SA/LA en el grupo tratado con L-FK506 es similar a la del control, indicando que en estos pulmones no hay alteración en el metabolismo intraalveolar del surfactante. En contraste, los pulmones transplantados del grupo tratado con liposomas presentaron un aumento de la cantidad de fosfolípidos en SA, pero no en LA, lo que indica que en estos pulmones, al igual que en los del grupo no tratado, hay una alta transformación de LA en SA y por tanto una relación SA/LA alta, indicativa de daño alveolar.

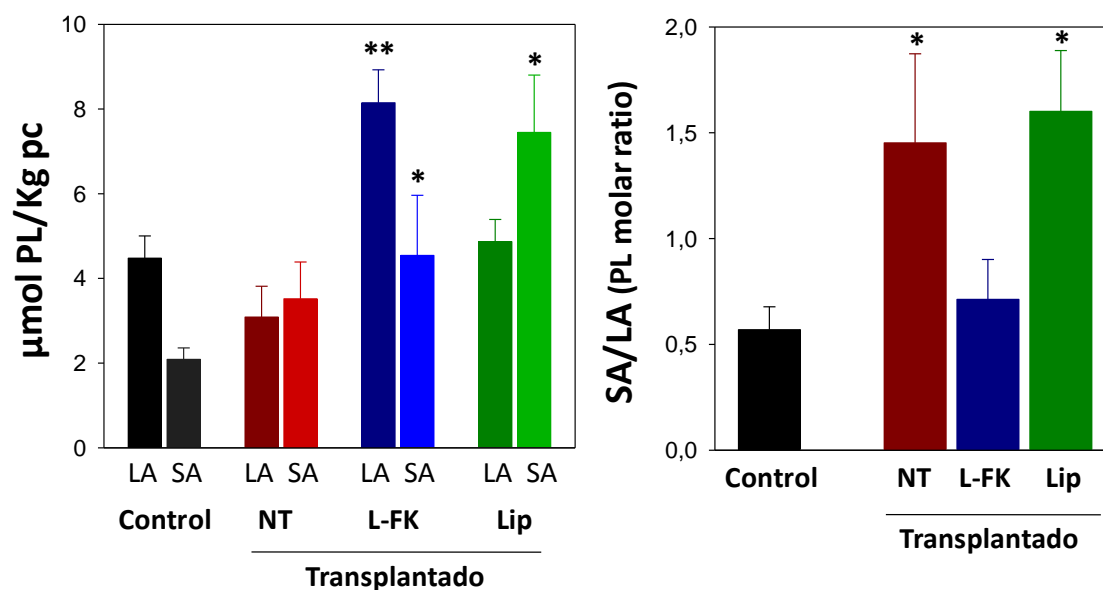


Figura 11: (izquierda): Contenido en fosfolípidos en agregados grandes (LA) y pequeños (SA) de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas (Lip). (derecha): Relación del contenido en fosfolípidos de agregados grandes y pequeños (SA/LA) de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas (Lip). * $p < 0.05$ vs Control. ** $p < 0.01$ vs Control.

Como indica la Figura 12, la relación proteína/fosfolípido en los LA de pulmones control fue muy baja, unas 35 veces menor que la relación en los SA. En los pulmones transplantados del grupo no tratado la relación proteína/fosfolípido en LA aumentó significativamente debido a la disminución en la cantidad de fosfolípidos y al incremento en la cantidad de proteína por contaminación por proteínas plasmáticas como consecuencia del edema. El tratamiento con L-FK506 normalizó también esta relación, debido tanto al incremento de fosfolípidos en los LA como a la prevención de la extravasación de proteínas plasmáticas al alveolo tras el transplante de pulmón.

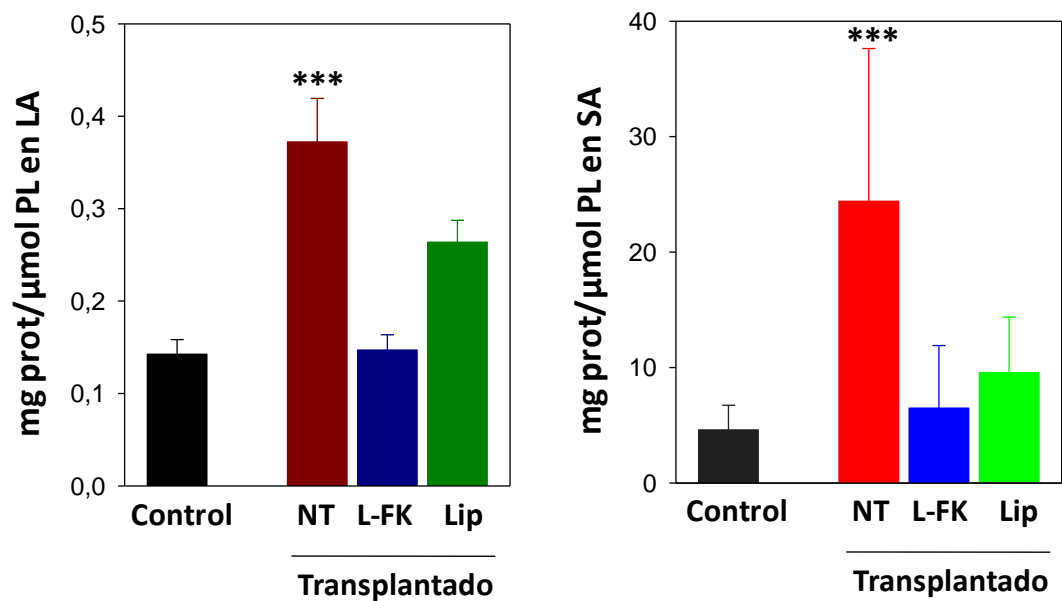


Figura 12: Relación proteína/fosfolípido en agregados grandes (izquierda) y pequeños (derecha) de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas (Lip) ***p<0.001 vs Control.

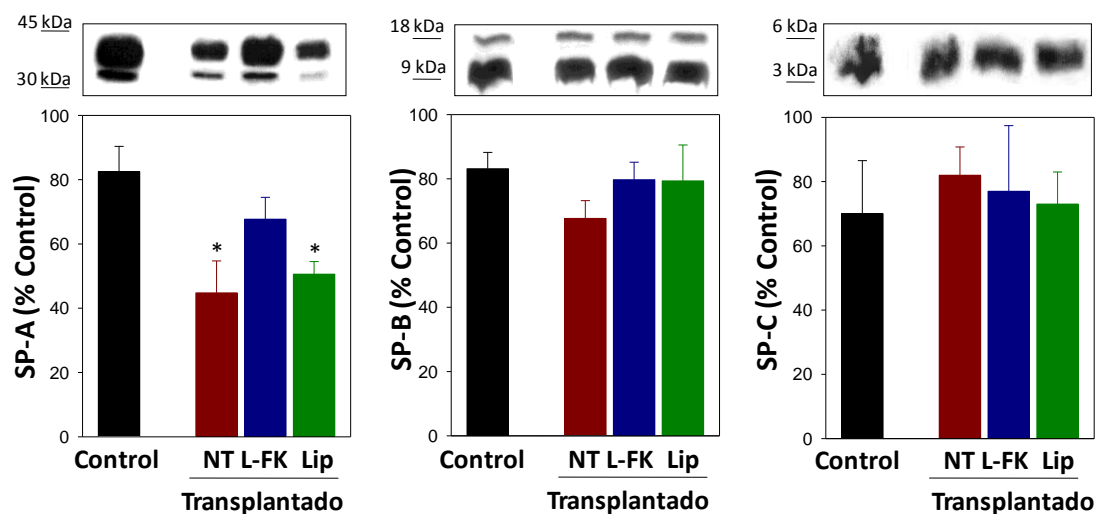


Figura 13: Bandas representativas de Western blot (paneles superiores) y contenido en SP-A (izquierda), SP-B (centro) y SP-C (derecha) en agregados grandes del surfactante (paneles inferiores) de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas (Lip). Las gráficas se realizaron a partir del densitometrado de las bandas características obtenidas en los Western blot. En todos los casos se partió de la misma cantidad de proteína total. *p<0.05 vs Control.

La Figura 13 muestra los análisis por Western blot de las proteínas específicas del surfactante SP-A, SP-B y SP-C. Respecto a la SP-A, los pulmones transplantados del grupo no tratado presentaron unos niveles significativamente menores que los de los pulmones control. Los bajos niveles de SP-A pueden indicar un aumento en su degradación por la acción de proteasas (lo que facilita la conversión de LA en SA) o bien una disminución en su síntesis y secreción. El tratamiento con L-FK506, pero no con liposomas, condujo a una normalización en el porcentaje de SP-A, indicando que la prevención de la inflamación por producida por el L-FK506 es necesaria para impedir la disminución de la SP-A. Aunque los fosfolípidos disminuyeron la secreción de TNF- α esto no es suficiente para impedir que los niveles de SP-A disminuyan. Respecto a las proteínas hidrofóbicas, SP-B y SP-C, no se apreciaron cambios significativos entre los pulmones control y ninguno de los grupos transplantados.

4.4.2. Funcionalidad del surfactante pulmonar

La funcionalidad del surfactante pulmonar se determinó midiendo la capacidad del LA de adsorberse y extenderse en una interfase aire-líquido. La cantidad de fosfolípidos de LA inyectados en la hipofase fue la misma para todas las muestras. La adsorción interfacial se midió registrándose los cambios en la presión superficial a lo largo del tiempo.

La Figura 14 indica que mientras que el LA de los pulmones control presentó una cinética de adsorción interfacial típica de un buen surfactante, alcanzando rápidamente la presión de equilibrio de 45 mN/m, el LA de los pulmones transplantados del grupo no tratado presentó una cinética de adsorción mucho más lenta, no llegando a alcanzar la presión de equilibrio en el tiempo que duró el experimento. El tratamiento con L-FK506 normalizó la actividad biofísica del surfactante. Sin embargo, el tratamiento con liposomas presentó una cinética de adsorción interfacial similar a la de los pulmones transplantados del grupo no tratado. Este proceso depende sobre todo de la presencia de SP-B y SP-C (que no presentan variación entre los grupos, (Figura 13), de la adecuada fluidez y estructura de las membranas del surfactante (Saenz *et al.* 2006) y de la acción coestimuladora de la SP-A, que disminuye en pulmones transplantados de los grupos no tratado y tratado con liposomas (Figura 13); y está inhibido por la CRP (Saenz *et al.* 2010), que se asocia a las membranas del surfactante (Casals *et al.* 1998), y por estrés oxidativo. Para conocer el estado de oxidación de los lípidos y las proteínas presentes en

el LA se determinó el nivel de peroxidación lipídica y de carbonilación de las proteínas presentes en el LA. La Figura 15 muestra que tanto los pulmones transplantados del grupo no tratado como del grupo tratado con liposomas presentaron unos valores de oxidación de lípidos y proteínas en la fracción activa del surfactante mayores que los de los pulmones control, mientras que el tratamiento con L-FK506 normalizó esta situación.

Todos estos datos indican que el tratamiento con L-FK506, pero no con liposomas, mantiene la composición y la actividad biofísica del surfactante pulmonar que se ve enormemente alterada tras el transplante de pulmón como consecuencia del daño por isquemia-reperfusión.

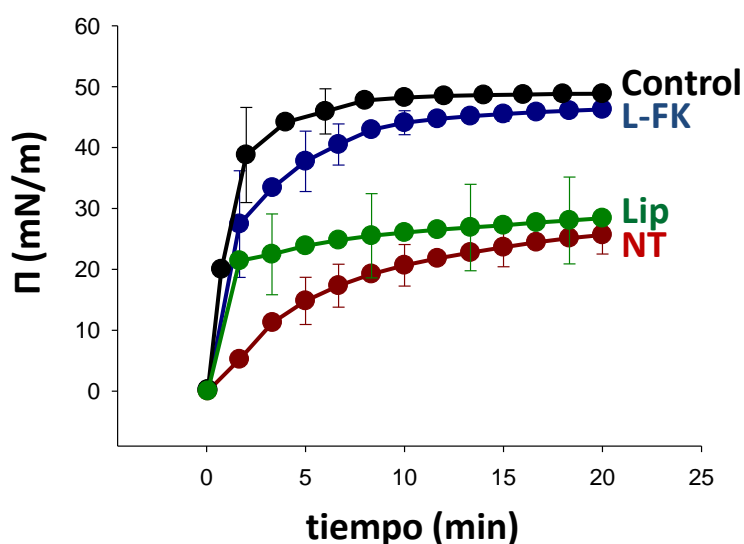


Figura 14: Cinéticas de adsorción interfacial de agregados grandes del surfactante de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas (Lip). Π : presión superficial. En todos los casos la concentración final de fosfolípidos en la hipofase fue de 83 nmoles/ml. Las diferencias en las cinéticas de los NT y Lip fueron significativas con respecto a la del Control ($p < 0.001$).

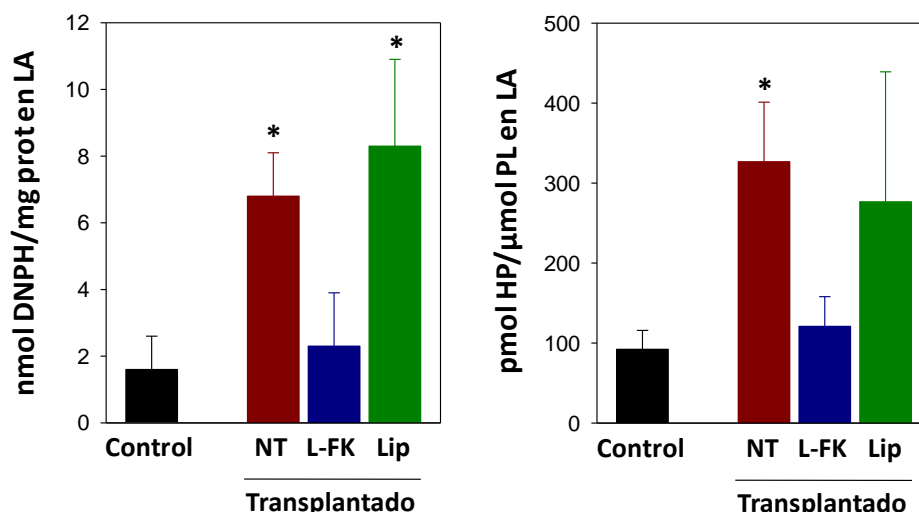


Figura 15: Oxidación de los componentes de la fracción activa del surfactante pulmonar, tanto proteicos (izquierda) como lipídicos (derecha), de pulmones control y transplantado de los grupos no tratado (NT), tratado con L-FK506 (L-FK) y tratado sólo con liposomas (Lip). * $p < 0.05$ vs Control.

Para asegurar que todas estas alteraciones se debieron al daño por isquemia-reperfusión y no al periodo de 22 horas de isquemia, se realizaron algunos estudios a partir del lavado broncoalveolar de los pulmones preservados, es decir, el pulmón derecho del animal donante mantenido durante 22 horas en isquemia. Los resultados presentados en la Figura 16 demuestran que no existen diferencias en la composición y funcionalidad del surfactante pulmonar entre los pulmones control y preservado, y que en el pulmón preservado no hay edema, lo que demuestra que, efectivamente, todas las alteraciones anteriormente descritas son debidas al contexto inflamatorio producido por el proceso de isquemia-reperfusión. De la misma forma, no se detectaron diferencias entre los pulmones control y nativo, esto es, el pulmón derecho del receptor, por lo que las alteraciones producidas en el receptor como consecuencia del daño por isquemia-reperfusión estuvieron restringidas al pulmón transplantado.

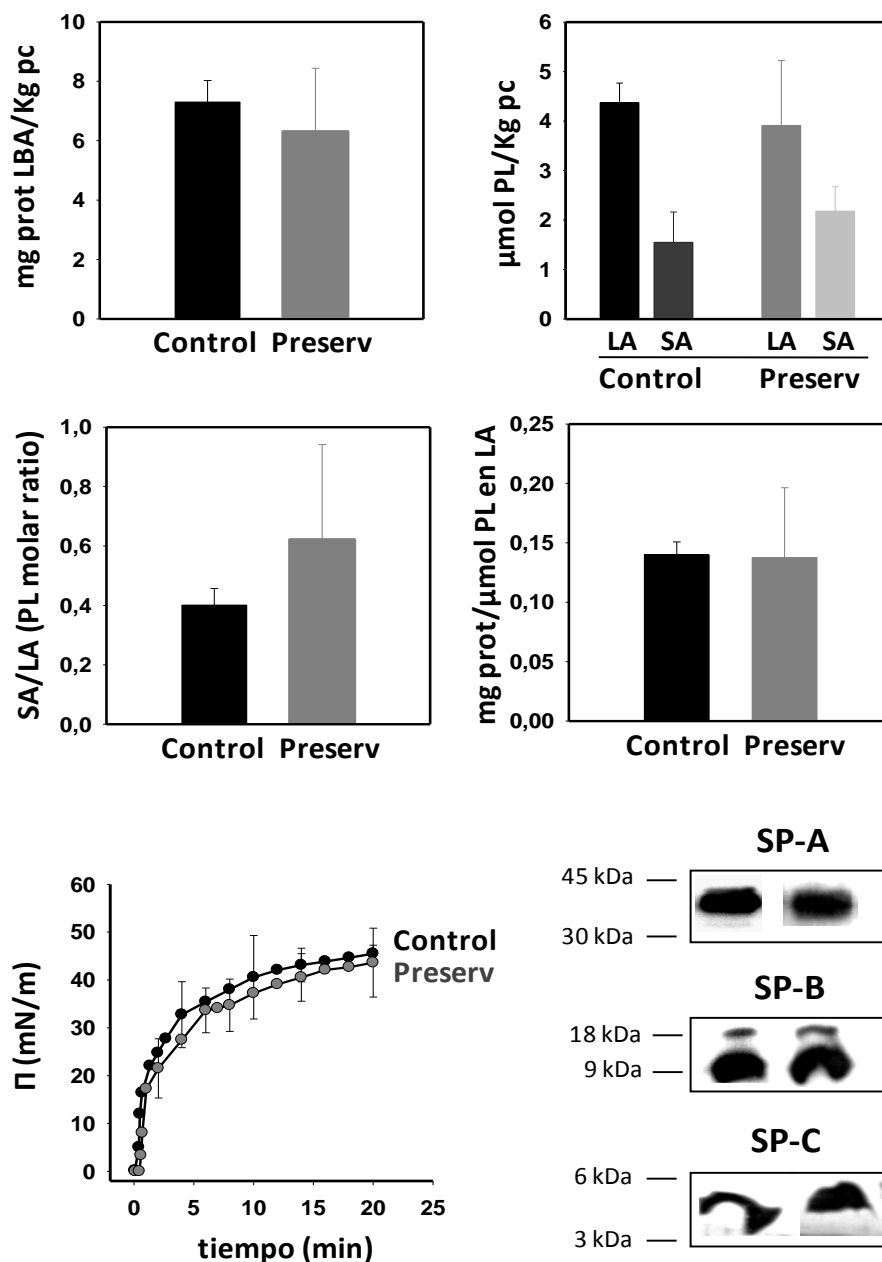


Figura 16: Comparación entre pulmones control y preservado (Preserv). (arriba izquierda): contenido en proteína total en el LBA libre de células de pulmones control y preservado; (arriba derecha): contenido en fosfolípidos en agregados grandes (LA) y pequeños (SA) de pulmones control y preservado; (centro izquierda): relación del contenido en fosfolípidos de agregados grandes y pequeños (SA/LA) de pulmones control y preservado; (centro derecha): relación proteína/fosfolípido en agregados grandes de pulmones control y preservado; (abajo izquierda): cinéticas de adsorción interfacial de agregados grandes de pulmones control y preservado; (abajo derecha): Bandas representativas de Western blot de SP-A, SP-B y SP-C en agregados grandes de pulmones control y preservado.

5. DISCUSIÓN

En este capítulo se ha estudiado el potencial uso terapéutico de una preparación de tacrolimus encapsulado en vesículas de fosfolípidos similares a los que componen el surfactante pulmonar para ser administrado por vía intratraqueal para prevenir el daño por isquemia-reperfusión en un modelo de trasplante de pulmón.

Nuestros resultados demuestran que el trasplante de pulmón con isquemia en frío de 22 horas conlleva un daño por isquemia-reperfusión extenso, caracterizado por (i) disminución significativa de la oxigenación arterial y aumento de shunt intrapulmonar en el animal receptor; (ii) aumento de la extravasación de proteínas plasmáticas en el espacio alveolar de pulmones transplantados; (iii) infiltración de neutrófilos en el espacio alveolar de los pulmones transplantados; (iv) oxidación de proteínas presentes en el lavado alveolar; (v) aumento de marcadores de daño en el fluido alveolar, tales como TNF- α , CRP y esfingomielinasa ácida; e (vi) inactivación de la actividad biofísica del surfactante pulmonar aislado de los pulmones transplantados.

La inactivación del surfactante ocurre como consecuencia de distintos procesos que disminuyen la adsorción de los fosfolípidos a la interfase aire-líquido y/o que evitan que la monocapa interfacial alcance bajas tensiones superficiales en las etapas de compresión (Zuo *et al.* 2008). Nuestros datos indican que la alteración de la adsorción interfacial del surfactante aislado de pulmones trasplantados se debe a:

- 1) Aumento significativo en la oxidación de lípidos y proteínas que componen los agregados grandes del surfactante (LA). Las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno liberadas por macrófagos y/o neutrófilos en el proceso inflamatorio podrían estar involucradas en la oxidación de LA, y se ha demostrado que la peroxidación de lípidos y proteínas del surfactante conduce a su inactivación (Rodríguez-Capote *et al.* 2006).
- 2) Acelerada velocidad de conversión de LA (fracción activa del surfactante) en agregados pequeños (SA) (fracción inactiva), probablemente debido a las alteraciones estructurales causadas por la oxidación.
- 3) Reducción en el contenido de la apolipoproteína del surfactante SP-A en los LA, lo que directamente afecta a la adsorción del surfactante pulmonar (Valino *et al.* 2004) y a la velocidad de conversión LA→SA (Zuo *et al.* 2008).

- 4) Aumento de CRP en el fluido alveolar, que se asocia a membranas del surfactante y es un potente inhibidor de la actividad biofísica del surfactante (Saenz *et al.* 2010). Además, la disminución de los niveles de SP-A aumenta la susceptibilidad del surfactante de ser inhibido por CRP, ya que recientemente hemos demostrado que la SP-A se une a la CRP y bloquea los efectos inhibitorios de la CRP sobre el surfactante pulmonar (Saenz *et al.* 2010).

En conjunto, estos datos permiten concluir que la oxidación de lípidos y proteínas del surfactante, la disminución de SP-A, y el aumento de CRP en pulmones transplantados rinden un surfactante con débil actividad interfacial, lo que generaría un pulmón con tendencia a la atelectasis.

La administración intratraqueal de 0.2 mg/kg de tacrolimus liposomal en el pulmón izquierdo del donante antes del periodo de isquemia mejoró significativamente la oxigenación arterial en el animal receptor debido a que disminuye la inflamación en el injerto. Hay evidencias de que el tacrolimus administrado vía intravenosa es útil como antiinflamatorio en un modelo de daño por isquemia-reperfusión en el pulmón (Krishnadasan *et al.* 2002) pero nuestro estudio demuestra por vez primera los efectos beneficiosos de tacrolimus liposomal, administrado intratraquealmente, en un modelo de daño por isquemia-reperfusión tras el trasplante pulmonar.

Krishnadasan y colaboradores (2002) demostraron que la administración intravenosa de una dosis de 0.2 mg/kg de tacrolimus antes del periodo de isquemia mejora significativamente el cuadro inflamatorio en el pulmón sometido al daño por isquemia-reperfusión, siendo esta mejora muy superior a la obtenida con una administración i.v. de tacrolimus 5 minutos antes o 2 horas después de la reperfusión. El mayor efecto de la administración i.v. de tacrolimus antes del periodo de isquemia que después de la reperfusión podría sugerir que el efecto principal de tacrolimus es a nivel de los macrófagos alveolares, principales responsables de la etapa temprana del daño por isquemia-reperfusión (Naidu *et al.* 2003). En nuestro modelo de trasplante pulmonar, el tacrolimus liposomal podría tener una acción inmunosupresora sobre los macrófagos alveolares del donante bloqueando la cascada de procesos inflamatorios que se disparan tras la reperfusión, y en el capítulo 1 se demuestra que la vehiculización de tacrolimus en nanoliposomas refuerza drásticamente la acción antiinflamatoria de tacrolimus, al evadir la acción de la P-glicoproteína que expulsa al tacrolimus de las células.

Nuestros resultados indican que el tacrolimus liposomal, pero no los liposomas utilizados como vehículo, previene la infiltración de neutrófilos y el edema intraalveolar. Además disminuye la oxidación de proteínas presentes en el fluido y los niveles o actividad de todos los marcadores inflamatorios evaluados. La disminución de la inflamación en el grupo de pulmones transplantados tratados con L-FK506 es consistente con el hecho de que el surfactante pulmonar aislado de estos pulmones es activo y su composición y estado de oxidación no está alterada. El tacrolimus liposomal bloquea la conversión LA→SA, previene la disminución de los niveles de SP-A, la oxidación de lípidos y proteínas presentes en los agregados grandes del surfactante, y la contaminación de éste por proteínas del plasma.

Por otra parte, en este estudio hemos demostrado, por vez primera, que la actividad enzimática esfingomielinasa ácida (SMasa) está significativamente incrementada en el fluido alveolar tras el daño pulmonar agudo inducido por isquemia-reperfusión en el trasplante del pulmón. La SMasa ácida puede ser considerada como un marcador de daño ya que sus niveles se reducen si disminuye la inflamación en presencia de tacrolimus liposomal. Estudios *in vitro* demuestran que esta enzima se secreta por distintos tipos celulares, tales como células endoteliales y macrófagos, en respuesta a diversos estímulos inflamatorios (Wong *et al.* 2000). Es concebible que la SMasa secretada al fluido alveolar hidrolice la esfingomielina situada preferentemente en dominios líquido-ordenados (“rafts”) de la cara externa de la membrana plasmática de las células alveolares, generando ceramida. En este sentido, estudios recientes (Zimmerman and McIntyre 2004) (Barnes 2004) (Goggel *et al.* 2004) (Petrache *et al.* 2005) implican la hidrólisis de esfingomielina en la lesión pulmonar aguda. Se ha demostrado que el edema pulmonar inducido por PAF se reduce en ratones deficientes en SMasa o por instilación de anticuerpos que bloquean específicamente la ceramida (Goggel *et al.* 2004). Por tanto, la disminución de la actividad esfingomielinasa ácida producida por el potente efecto antiinflamatorio del tacrolimus liposomal resulta muy beneficioso para disminuir la perpetuación del daño por isquemia-reperfusión tras el trasplante pulmonar.

Es interesante el hecho de que tanto los niveles de TNF- α como de CRP disminuyan en presencia de liposomas de DPPC/POPG, lo que indica que esta preparación liposomal, que sirve como vehículo para administrar el tacrolimus, no sólo no es tóxica para las

células sino que tiene también cierto efecto antiinflamatorio. Con respecto al pulmón, la CRP es considerada como un biomarcador sistémico de alteración de la función pulmonar (Novick *et al.* 1996) y un marcador del pronóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Erasmus *et al.* 1997) y fibrosis quística (Hausen *et al.* 1997). Más aún, los niveles de CRP aumentan en el fluido alveolar de individuos con distrés respiratorio agudo (Erasmus *et al.* 2002) y con daño por isquemia-reperfusión tras el trasplante pulmonar (Casals *et al.* 1998). La CRP presente en el fluido alveolar puede ser secretada por macrófagos alveolares y células epiteliales alveolares, especialmente tras ser estimuladas por mediadores proinflamatorios (Gould and Weiser 2001) (Dong and Wright 1996) (Ramage *et al.* 2004). Además la CRP presente en el fluido alveolar podría proceder del plasma que se extravasa al espacio alveolar en daño pulmonar agudo. Nuestros resultados sugieren que el aumento de CRP en el fluido alveolar tras el trasplante se debe a la secreción por parte de células alveolares ya que el tratamiento con liposomas de DPPC/POPG previene el aumento de los niveles de CRP en fluido alveolar, pero no previene el edema intraalveolar y la extravasación de proteínas plasmáticas.

El tratamiento con liposomas evita, además, el aumento de TNF- α en el fluido alveolar, pero no afecta a la infiltración de neutrófilos, lo que sugiere que los niveles de TNF- α detectados en el fluido alveolar, podrían haber sido secretados por los macrófagos en la etapa temprana del daño por isquemia-reperfusión. Hay estudios recientes que demuestran que la administración de un surfactante exógeno de origen porcino tiene un efecto antiinflamatorio en modelos de isquemia-reperfusión en pulmón (van Putte *et al.* 2009). Estos autores sugieren que los fosfolípidos podrían ser responsables del efecto antiapoptótico que tiene dicho surfactante pulmonar, lo que concuerda con el efecto antiapoptótico de los liposomas sobre linfocitos T detectado en pulmones transplantados tratados con liposomas.

En resumen, los resultados de este capítulo demuestran que el tratamiento intratraqueal de tacrolimus liposomal antes del periodo de isquemia previene la inflamación asociada al daño por isquemia-reperfusión tras el trasplante de pulmón y preserva la composición y función del surfactante pulmonar y la función pulmonar. Además, la administración intratraqueal de tacrolimus liposomal permite alcanzar concentraciones terapéuticas en el tejido pulmonar, y eventualmente dirigirse directamente a los

macrófagos alveolares, células estrechamente implicadas en la respuesta pro-inflamatoria. La vía de administración no es invasiva, dirige el fármaco al órgano diana y es esperable que disminuyan los efectos adversos que ocurren tras la administración intravenosa de tacrolimus disuelto en aceite de castor hidrogenado sobre el hígado y riñón (Plosker and Foster 2000). Los resultados demuestran que los nanoliposomas empleados para la vehiculización del tacrolimus, de composición similar a las membranas del surfactante, permiten la llegada del fármaco hasta los alveolos pulmonares, y no sólo no presentan toxicidad sino que contribuyen a disminuir la inflamación.

CAPÍTULO 3

Caracterización de los complejos tacrolimus/SP-A, proteína mayoritaria del fluido alveolar

1. RESUMEN

Una de las potenciales nuevas vías de administración de tacrolimus para el tratamiento de patologías respiratorias es la nebulización directa de nanopartículas de tacrolimus al pulmón. La SP-A es la proteína específica mayoritaria del surfactante pulmonar y la más abundante en el fluido alveolar. Debido a su capacidad de unión a diferentes ligandos, SP-A es capaz de realizar diversas funciones en el pulmón, relacionadas tanto con el surfactante pulmonar como con la respuesta inmune. Nuestro grupo ha demostrado que la SP-A se une al tacrolimus (Canadas *et al.* 2005), por lo que el objetivo de este capítulo consistió en la caracterización de dicha unión y en la determinación del efecto de la unión del fármaco en la estructura, propiedades y funciones de la proteína. Los resultados demuestran que el tacrolimus se une a la SP-A con una alta afinidad, con una constante de disociación de 13 ± 1 nM. La unión del fármaco a la SP-A, probablemente en el dominio de colágeno, modificó la estructura de la proteína, lo que se tradujo en un aumento de la capacidad de la SP-A de autoasociarse, agregar vesículas de fosfolípidos y agregar el lipopolisacárido bacteriano. La unión de ambas moléculas no modificó la actividad de la SP-A de promover la adsorción interfacial de las membranas de surfactante ni tampoco las actividades antimicrobianas e inmunosupresoras sobre linfocitos T. Además, la unión de la SP-A al tacrolimus tampoco afectó negativamente a las propiedades inmunosupresoras del fármaco sobre linfocitos T. Con todos estos datos se puede concluir que la unión entre el tacrolimus y la SP-A no sólo no afectó negativamente a las características de la proteína sino que incluso fue capaz de mejorar sus propiedades de unión a ligandos, y que la potencial interacción entre SP-A y tacrolimus tras su administración intratraqueal no altera las propiedades inmunomoduladoras de la SP-A y tacrolimus así como las propiedades de la SP-A ligadas a la función del surfactante y a la defensa frente a patógenos.

2. INTRODUCCIÓN

La SP-A es la proteína específica mayoritaria del surfactante pulmonar. Pertenece a la familia de las colectinas, proteínas caracterizadas por tener un dominio N-terminal de tipo colagénico y un dominio C-terminal que incluye el dominio de reconocimiento de carbohidratos (Lu *et al.* 2002). A diferencia de otras colectinas, la SP-A es una proteína capaz de unirse a lípidos, lo que la permite asociarse estrechamente con las membranas del surfactante pulmonar.

La estructura primaria de la SP-A se caracteriza por poseer cuatro dominios (Palaniyar *et al.* 2001): 1) un segmento N-terminal (7-10 aminoácidos), implicado en la formación de puentes disulfuro intercatenarios; 2) un dominio tipo colágeno (79 aminoácidos) caracterizado por 23 repeticiones Gly-X-Y interrumpidos cerca del punto medio del dominio; 3) una región de cuello (35 aminoácidos) que presenta una estructura α -helicoidal y que sirve de nexo de unión entre el dominio globular y el de colágeno; y 4) un dominio C-terminal (115 aminoácidos) implicado en la unión de SP-A a calcio, carbohidratos y fosfolípidos.

La estructura cuaternaria de la SP-A consiste en un octadecámero cuyos monómeros, de 36 kDa, se asocian entre sí formando trímeros (estabilizados por la formación de la triple hélice de colágeno) y éstos, a su vez, se ensamblan hexagonalmente mediante asociación lateral de hélices de colágeno. El conjunto se estabiliza mediante la formación de puentes disulfuro intercatenarios en la región N-terminal. El octadecámero tiene un tamaño de entre 600-700 kDa, 20 nm de longitud y forma una estructura similar a la de ramo de flores. El ensamblaje supratrimérico de la proteína es esencial para el desarrollo de su función (Sanchez-Barbero *et al.* 2005) (Sanchez-Barbero *et al.* 2007).

La SP-A es capaz de unirse a una gran cantidad de ligandos (Casals and Garcia-Verdugo 2005). Dado que posee un dominio de C lectina reconoce carbohidratos presentes en glicolípidos y glicoproteínas que cubren la superficie de bacterias, virus y hongos en presencia de calcio. A través del dominio de lectina también se une a algunos receptores presentes en la superficie de macrófagos, tales como SIRP- α (Gardai *et al.* 2003), TL-4 o MD-2 (Yamada *et al.* 2006). Además del dominio de C lectina, el dominio globular también contiene el sitio de unión a lípidos, a través del cual la SP-A se une a los lípidos presentes en el surfactante pulmonar, en las membranas celulares y en las membranas de microorganismos. Entre ellos, se une al lipopolisacárido bacteriano presente en la pared de las bacterias Gram (-) a través del lípido A de una manera independiente de calcio (Garcia-Verdugo *et al.* 2005). Además del dominio globular, la SP-A también es capaz de unirse a diversos receptores presentes en la membrana plasmática de células a través de otros dominios. Así, la SP-A se une al complejo calreticulina/CD91 en macrófagos (Gardai *et al.* 2003) o al receptor de SP-A, SPR210 en macrófagos, linfocitos o neumocitos tipo II (Borron *et al.* 1998) por el

dominio colagénico, y al CD14 en macrófagos (Sano *et al.* 1999) por la región del cuello.

Las funciones de la SP-A se derivan de esta capacidad de unir ligandos y pueden englobarse en funciones relacionadas con el surfactante pulmonar, funciones inmunomoduladoras y funciones antimicrobianas (Casals and Garcia-Verdugo 2005). Con respecto a las funciones relacionadas con el surfactante pulmonar, la SP-A es capaz de promover la adsorción interfacial del surfactante, generar la mielina tubular junto con la SP-B y prevenir la inactivación del surfactante por meconio (Sun *et al.* 1997) y proteínas del plasma (Cockshutt *et al.* 1990) (Yukitake *et al.* 1995). Con respecto a las funciones antimicrobianas, la SP-A se une a distintos patrones moleculares asociados a patógenos, facilitando su eliminación por fagocitosis o por el sistema mucociliar. Además, la SP-A es capaz de inhibir el crecimiento de cepas bacterianas que expresan fenotipo rugoso (Wu *et al.* 2003). Dicha capacidad parece ser independiente de la capacidad de la SP-A de aglutinar bacterias y se debería a un efecto directo de la proteína sobre la pared bacteriana. Con respecto a su actividad inmunomoduladora la SP-A es capaz de modular la respuesta inflamatoria en el alveolo mediante la unión a distintos receptores de células inmunes a través de sus distintos dominios (globular, cuello y colagénico). De esta manera la SP-A contribuye a mantener el alveolo esteril y poco inflamado y al mismo tiempo contribuye a la función surfactante evitando el colapso alveolar.

Una de las formas de administración del tacrolimus que se están estudiando es la del uso de nanopartículas nebulizadas directamente al pulmón. Dado que la proteína mayoritaria en el fluido alveolar es la SP-A y ésta es capaz de unirse a una gran cantidad de ligandos cabe pensar que podría unirse a un fármaco hidrofóbico como el tacrolimus. Nuestro grupo ha demostrado que la SP-A es capaz de unirse a un derivado fluorescente del tacrolimus con una constante de disociación, K_d , de 1×10^{-7} M (Canadas *et al.* 2005). Asimismo, otro trabajo de nuestro grupo demostró un incremento en la agregación de vesículas inducida por la SP-A cuando ésta se preincubó con el tacrolimus y, dado que la adición del fármaco sólo no produjo agregación de vesículas alguna, es esperable que el efecto se deba a la interacción del tacrolimus con la SP-A (Canadas *et al.* 2004).

Por ello, en este capítulo nos propusimos los siguientes objetivos: (i) caracterizar la unión entre el tacrolimus y la SP-A mediante dispersión de luz dinámica, que permite que la SP-A y el tacrolimus interaccionen en la solución en la que están dispersos, y

estudios con el fármaco inmovilizado en soporte sólido; (ii) determinar cómo afecta la unión de tacrolimus a las características estructurales de la proteína, mediante estudios de fluorescencia y dicroísmo; (iii) analizar el efecto del tacrolimus en las propiedades de la SP-A de autoasociación, agregación de vesículas de fosfolípidos y agregación de lipopolisacárido bacteriano de serotipo rugoso (Re-LPS); (iv) estudiar si la unión de tacrolimus a SP-A afecta a la capacidad de la proteína de promover la adsorción interfacial de membranas de surfactante; (v) determinar si la interacción tacrolimus /SP-A afecta a la capacidad de la SP-A de inhibir el crecimiento de bacterias y/ producir su muerte; y (vi) determinar si la interacción tacrolimus/SP-A afecta a las propiedades inmunosupresoras tanto del tacrolimus como de la SP-A sobre linfocitos T.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento de la SP-A

La SP-A se aisló a partir de aspirados broncoalveolares de pacientes con proteinosis de forma similar a (Sanchez-Barbero *et al.* 2005). El aspirado se resuspendió en 25 ml de tampón Tris/HCl 25 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y se centrifugó a 100000 g durante 1 hora y a 4 °C para la obtención del surfactante. El precipitado se homogenizó en 20 ml de NaCl al 0.9 % y se realizó un Lowry para cuantificar la cantidad de proteína total. A continuación, el surfactante se añadió lentamente a un volumen de n-butanol (1:30 p/v butanol/proteína total) para la realización de la extracción orgánica. Tras media hora de agitación la suspensión se centrifugó a 5000 g durante 30 minutos y a 15 °C, y el sedimento resultante se secó completamente en corriente de nitrógeno. Posteriormente el sedimento se homogenizó en potter en un tampón Hepes 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, con detergente n-octilglucósido 20 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y se centrifugó a 160000 g, durante 30 minutos y a 15 °C. Tras repetir el proceso una segunda vez, el precipitado se resuspendió en Tris/HCl pH 7.4 y se realizó la diálisis con una bolsa de éster de celulosa con tamaño de poro límite de 300 kDa (Spectra/Por, Spectrum, California, USA) para la eliminación del detergente. Una vez recuperado el volumen éste se centrifugó a 100000 g durante 30 minutos y a 4 °C para la eliminación de los agregados de SP-A que se quedaran en el precipitado. Finalmente el sobrenadante se congeló a -20 °C y se realizó un Lowry para determinar la concentración de SP-A. La SP-A aislada se caracterizó mediante espectroscopía de fluorescencia intrínseca, dispersión de luz dinámica y electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes.

Además se realizaron ensayos de actividad biológica tales como autoasociación de la proteína inducida por calcio y la capacidad de la proteína de agregar vesículas lipídicas en presencia de calcio.

3.2. Estudios de unión SP-A/FK506 mediante dispersión de luz dinámica

El tamaño hidrodinámico de la SP-A, el FK506 y la mezcla de ambos se midió a 25 ± 0.1 °C en un Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipado con un laser He-Ne (633 nm) y un peltier. El diámetro hidrodinámico se calculó usando el algoritmo “general purpose”, del software de Malvern para el análisis de dispersión de luz dinámica, el cual emplea el coeficiente de difusión y lo relaciona con el diámetro hidrodinámico a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

donde k_B es la constante de Boltzman, T es la temperatura, η la viscosidad, y D es el coeficiente de difusión traslacional. La interacción de FK506 con SP-A se estudió añadiendo distintas concentraciones de FK506 disuelto en metanol ($\square 1$ % del volumen total) a 8 $\mu\text{g/ml}$ de SPA en tampón Tris/HCl 5 mM pH 7.4 o en tampón Tris/HCl 5 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM.

3.3. Estudios de unión SP-A/FK506 en soporte sólido

Para realizar los ensayos de unión en soporte sólido se añadió el tacrolimus (concentración de 50 μM en metanol) a una placa de poliestireno (Polysorp®, Nunc, Rochester, NY) y se la dejó incubando toda la noche a 37 °C hasta la evaporación total del disolvente orgánico. Al día siguiente la placa se bloqueó con Tris/HCl 5 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM con 5% de leche (p/v) durante 2 horas a temperatura ambiente y, tras una etapa de lavado, se incubó con distintas concentraciones de SP-A biotinilada en tampón Tris/HCl 5 mM pH 7.4, NaCl 150 mM con 2.5 mM de Ca^{2+} durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado, la placa se incubó con estreptavidina-peroxidasa en el tampón anterior durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente, la enzima se reveló con OPD y se paró la reacción con H_2SO_4 . Se leyó la absorbancia de la solución en la placa a 492 nm en un lector de placas de ELISA DIGISCAN (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

3.4. Estudios de unión SP-A/DPPC en soporte sólido en presencia de FK506

Para analizar si la unión del FK506 a la SP-A afectaba a la unión de la proteína a la DPPC se procedió de manera similar a la descrita para la unión de SP-A/FK506 en el apartado 3.3, añadiendo DPPC (concentración de 50 μ M en metanol) a una placa de poliestireno e incubando la placa con distintas concentraciones de SP-A y FK506.

3.5. Ensayos de fluorescencia intrínseca de la SP-A en presencia de FK506

Los espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A se recogieron en un espectrofluorímetro SLM-Aminco AB2 (USA) termostatzado con un baño. Las cubetas utilizadas fueron de cuarzo de 5×5 mm y un ancho de rendija de 4 nm para el haz de emisión y excitación. La temperatura a la que se realizó el ensayo fue de 25 ± 0.1 °C y el volumen final en la cubeta fue de 500 μ l de tampón Tris/HCl 5 mM pH 7.4. La SP-A (concentración final de 5 μ g/ml) se incubó durante 5 minutos con distintas concentraciones de FK506 disuelto en metanol (< 1 % del volumen total) y a continuación se excitó a 275 nm y se recogió el espectro de emisión desde 290 nm a 400 nm. Posteriormente las distintas muestras se incubaron durante 5 minutos con CaCl₂ (concentración final 2.5 mM) y se registró el espectro de emisión en presencia de Ca²⁺. En paralelo a los espectros de las distintas muestras se realizaron los controles correspondientes.

3.6. Ensayos de dicroísmo circular de la SP-A en presencia de FK506

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco J-715 dotado de una lámpara de xenon de 150 W, en condiciones semejantes a las empleadas en (Ruano *et al.* 1998). La muestra se refrigeró mediante un baño que circulaba agua a través de la cubeta. Se empleó una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico y se registró el espectro de dicroísmo de la SP-A (concentración final de 80 μ g/ml) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de FK506 disuelto en metanol (< 1% del volumen total) en el ultravioleta lejano (190-260 nm) a una velocidad de 50 nm/minuto. La temperatura a la que se realizó el ensayo fue de 25 ± 0.1 °C y el volumen final en la cubeta fue de 150 μ l de tampón Tris/HCl 5 mM pH 7.4. Cada espectro es la media de cuatro registros acumulados. Una vez restados los

correspondientes blancos, la señal de dicroísmo circular se transformó en elipticidad molar ($\text{grados} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$) al considerar la concentración molar de aminoácidos de cada muestra (como masa molecular media por aminoácido se tomó el valor de 110 Da). Seguidamente se redujo el ruido aplicando un filtro *Fast Furier Transformation*. Todas estas operaciones se hicieron con el programa Spectra Manager de Jasco versión 1.53. La estimación del contenido en estructura secundaria se realizó tras la desconvolución de los espectros en cuatro componentes simples (α -hélice, lámina- β , giro- β y ovillo estadístico) de acuerdo con el algoritmo de restricción convexa (convex constraint algorithm, CCA) (Perczel *et al.* 1992).

3.7. Ensayos de autoasociación de la SP-A en presencia de FK506

El ensayo de autoasociación de la SP-A en presencia de distintas concentraciones de FK506 se realizó midiendo los cambios de densidad óptica a 360 nm a lo largo del tiempo en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) equipado con un peltier. Se utilizaron cubetas de 0.2x1 cm de paso óptico y la temperatura a la fue 25 ± 0.1 °C. El volumen del ensayo fue de 400 μl de tampón Tris/HCl 5 mM pH 7.4. En cada experimento se incluyeron cubetas de referencia. En cada cubeta se añadió SP-A (concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$), en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FK506 disuelto en metanol ($\square 1$ % del volumen total), y se registró la absorbancia a lo largo de 10 minutos. Posteriormente se añadió 2.5 mM de Ca^{2+} para determinar la autoasociación de la proteína inducida por este catión, registrándose los cambios durante 15 minutos. Finalmente se añadió 5 mM de EDTA para revertir la autoasociación de SP-A producida por Ca^{2+} .

3.8. Ensayos de agregación de vesículas inducida por SP-A en presencia de FK506

El estudio del efecto de FK506 en la capacidad de SP-A de agregar vesículas lipídicas se realizó en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) utilizando cubetas de 0.2x1 cm de paso óptico. Se utilizaron vesículas de DPPC/POPG (8:2 p/p) preparadas tal y como se describe en el apartado 3.3 del Capítulo 1. Las vesículas unilamelares pequeñas resultantes se añadieron a una concentración final de 80 $\mu\text{g/ml}$ a las cubetas de muestra y referencia en un volumen total de 400 μl de tampón Tris/HCl 5 mM pH 7.4. Tras 10 minutos de atemperación a 25 ± 0.1 °C se

añadió la SP-A (concentración final 8 µg/ml, relación DPPC/POPG: SP-A 10:1 p/p) o la mezcla SP-A/distintas concentraciones de FK506 disuelto en metanol (□1 % del volumen total) a las cubetas de muestra y se midieron los cambios en la absorbancia a 400 nm en intervalos de 1 min durante 5 minutos. A continuación se añadió 2.5 mM de Ca^{2+} a las cubetas de muestra y referencia y se monitorizó el cambio en la absorbancia en intervalos de 1 min durante 15 minutos. Finalmente se añadió 5 mM de EDTA para revertir la agregación de vesículas lipídicas producida por SP-A.

3.9. Ensayos de agregación de Re-LPS inducido por SP-A en presencia de FK506

En estos ensayos se utilizó LPS rugoso de *Salmonella minnesota*, serotipo Re-LPS, (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a una concentración final de 40 µg/ml, preparado de la siguiente manera: la cantidad adecuada de Re-LPS se disolvió en una mezcla cloroformo/metanol/H₂O (17:7:1, v/v) y el disolvente se evaporó completamente, primero en corriente de nitrógeno y después en una centrífuga de vacío para eliminar las trazas. Posteriormente la mezcla se hidrató en un tampón Tris/HCl 5 mM pH 7.4, NaCl 150 mM durante 1 hora a 42 °C en un termomezclador (Eppendorf, Hamburg, Germany) con agitación continua. A continuación las muestras se sonicaron tal y como se describe en el apartado 3.3 del Capítulo 1. Los ensayos de agregación de LPS inducido por la SP-A en presencia de distintas concentraciones de FK506 se realizaron de manera similar a los estudios de agregación de vesículas lipídicas descritos en el apartado anterior. 40 µg/ml de Re-LPS se añadieron a las cubetas de muestra y referencia y se equilibraron a 25 ± 0.1 °C durante 10 min. El volumen del ensayo fue de 400 µl de tampón Tris/HCl 5 mM pH 7.4. A continuación se añadió la SP-A (concentración final 20 µg/ml, relación LPS/SP-A 2:1 p/p), sola o preincubada durante 5 min con distintas concentraciones de FK506 disuelto en metanol (□1 % del volumen total) a las cubetas de muestra, y se midieron los cambios en la turbidez a 400 nm durante 5 minutos en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, USA), utilizando cubetas de 0.2x1 cm de paso óptico. Seguidamente se añadió 2.5 mM de Ca^{2+} a las cubetas de muestra y referencia y se monitorizó el cambio en la absorbancia en intervalos de 1 min durante 15 minutos. Finalmente se añadió 5 mM de EDTA para revertir la agregación de Re-LPS producida por SP-A.

3.10. Ensayos de adsorción interfacial de membranas de surfactante pulmonar conteniendo SP-B y SP-C. Efecto de SP-A y/o tacrolimus

La capacidad de un extracto orgánico porcino de surfactante pulmonar de adsorberse y extenderse en una interfase aire líquido se determinó a 25 °C en una balanza de tipo Wilhelmy (Casals *et al.* 1998). Dicho extracto consiste en vesículas multilamelares formadas por el componente lipídico del surfactante pulmonar y conteniendo las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C. La capacidad de la SP-A en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FK506 de incrementar la adsorción de las membranas de surfactante a una interfase aire/agua se analizó inyectando la SP-A (5 µg/ml, relación fosfolípido/SP-A 10:1 p/p) y distintas concentraciones de FK506 disuelto en metanol (□1 % del volumen total) a la hipofase en una cubeta de teflón que contenía 6 ml de un tampón Hepes 5 mM, NaCl 150 mM y CaCl₂ 5 mM, pH 7 en agitación continua. Tras 10 minutos, se inyectaron a la hipofase las membranas de surfactante (400 nmoles de fosfolípido) y se midieron los cambios en la presión superficial en función del tiempo

3.11. Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano inducido por SP-A en presencia de FK506

Los ensayos de inhibición del crecimiento se realizaron con la cepa J5 de *Escherichia coli*. Un cultivo bacteriano en fase estacionaria se diluyó 1/200 en medio LB y se incubó con una concentración de SP-A de 25 µg/ml en ausencia y presencia de una concentración de tacrolimus de 0.5 µM a 37 °C y 250 rpm durante 6 horas. El crecimiento bacteriano se monitorizó midiendo la densidad óptica a 400 nm a intervalos de 1 hora en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

3.12. Ensayos de muerte bacteriana inducido por SP-A en presencia de FK506

Los ensayos de muerte bacteriana se realizaron con la cepa J5 de *Escherichia coli*. Un cultivo bacteriano, a una concentración de entre $0.5-2.5 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, se incubó con una concentración de SP-A de 25 µg/ml, en ausencia o presencia de una concentración de tacrolimus de 0.5 µM, a 37 °C y 250 rpm durante 30 minutos ó 3 horas. Tras la incubación, las suspensiones se diluyeron en tampón fosfato salino pH 7.2 (PBS), se sembraron alícuotas de 10 µl en placas de LB agar y se

incubaron a 37 °C durante toda la noche. La viabilidad bacteriana se estimó por conteo manual de las UFC de la placa.

3.13. Condiciones de cultivo de células Jurkat

El modelo celular utilizado para estudiar la capacidad inmunosupresora de tacrolimus, de SP-A o de ambos fue el de las células Jurkat (Figura 1). Se trata de una línea celular de linfocitos T humana derivada de un linfoma agudo que en presencia de distintos agentes, como la fitohemaglutinina (PHA) o el acetato de forbol miristato (PMA) es capaz de activarse y secretar interleuquina 2 (Weiss *et al.* 1984).

Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con HEPES y Glutamina con FBS al 10 % v/v (descomplementado a 56 °C, 30 minutos) y antibiótico (Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina B) al 1 % v/v. El crecimiento celular se realizó en recipientes de 75 cm² manteniendo las células a una concentración de entre 1×10⁵ y 5×10⁵ células/ml en un incubador a 37 °C y en una atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂. Los pases se realizaron cada 2-3 días, y no se sobrepasaron los 20 pases.

Número ATCC : TIB-152
Designación : Jurkat (Clon E6-1)

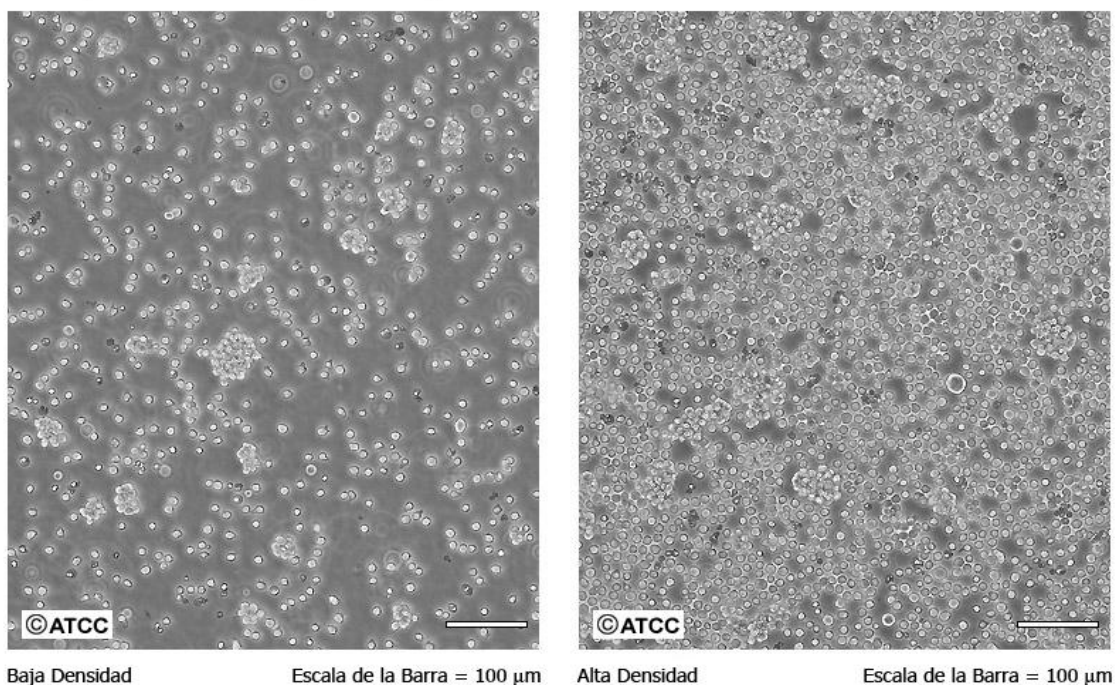


Figura 1: Morfología de las células Jurkat por microscopía óptica

3.14. Estimulación de células Jurkat

Los experimentos de estimulación se realizaron con las células Jurkat distribuidas en placas de 96 pocillos (0.5×10^6 células/ml) en medio RPMI 1640, 2 % FBS y 1 % de antibiótico. En todos los casos se realizaron triplicados experimentales, y la viabilidad celular se confirmó por exclusión con azul tripán. En un tipo de experimentos el tacrolimus se preincubó durante 5 minutos con la albúmina o SP-A antes de ser añadidos a los pocillos. En otro tipo de experimentos, el fármaco y la albúmina o SP-A se añadieron simultáneamente a los pocillos. Una vez añadidas las diferentes moléculas las células Jurkat se estimularon con PHA (concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$) y PMA (concentración final 10 nM). Tras una incubación de 48 horas a 37 °C y con un 5 % de CO_2 se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 3000 g y se cuantificaron los niveles de IL-2 en el sobrenadante por ELISA.

3.15. Cuantificación de IL-2

La cuantificación de la citoquina IL-2 se realizó mediante un ELISA (BD Biosciences, New Jersey, USA), a partir de los sobrenadantes celulares obtenidos tras la estimulación de las células Jurkat. En primer lugar se añadió el anticuerpo anti-IL-2 a los pocillos de una placa de poliestireno (Maxisorp®) y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Tras una etapa de lavado con PBS/Tween-20 0.05% (v/v) la placa se bloqueó con PBS/suero bovino fetal 10% (v/v) para evitar las uniones inespecíficas y se incubó con las distintas muestras donde estaba presente la IL-2, la cual se unirá al anticuerpo. Tras otra etapa de lavado para eliminar las proteínas no unidas, la placa se incubó con un segundo anticuerpo biotinilado anti-IL-2, y con el reactivo estreptavidina peroxidasa que se unirá al anticuerpo biotinilado. Tras un último lavado para eliminar el anticuerpo no unido, se procedió al revelado de la enzima con TMB y, una vez parada la reacción con H_2SO_4 , se leyó la absorbancia de la placa a 450 nm en un lector de placas de ELISA DIGISCAN (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

4. RESULTADOS

4.1. Estudios de unión tacrolimus/SP-A

4.1.1. Estudios de unión en solución por dispersión de luz dinámica

Para estudiar la interacción entre el tacrolimus y la SP-A en solución se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica. La Figura 2 muestra los análisis de dispersión de luz dinámica en ausencia de calcio de SP-A, tacrolimus y la mezcla SP-A/tacrolimus.

Para la proteína se obtuvo un único pico que corresponde a partículas con un diámetro hidrodinámico de 42 ± 6 nm. Para el fármaco, en el intervalo de concentraciones entre 10^{-15} y 10^{-5} M, se obtuvo un único pico correspondiente a un tamaño hidrodinámico de 387 ± 20 nm, mientras que a concentraciones mayores, entre 2×10^{-5} y 10^{-4} M, el pico se desplazó hasta los 461 ± 22 nm. Dado que en metanol las partículas de tacrolimus dan un pico de dispersión que corresponde a un tamaño de partícula de 1 nm, los resultados en disolución acuosa indican que en solución acuosa el fármaco se encuentra en forma de agregados debido a su alta hidrofobicidad.

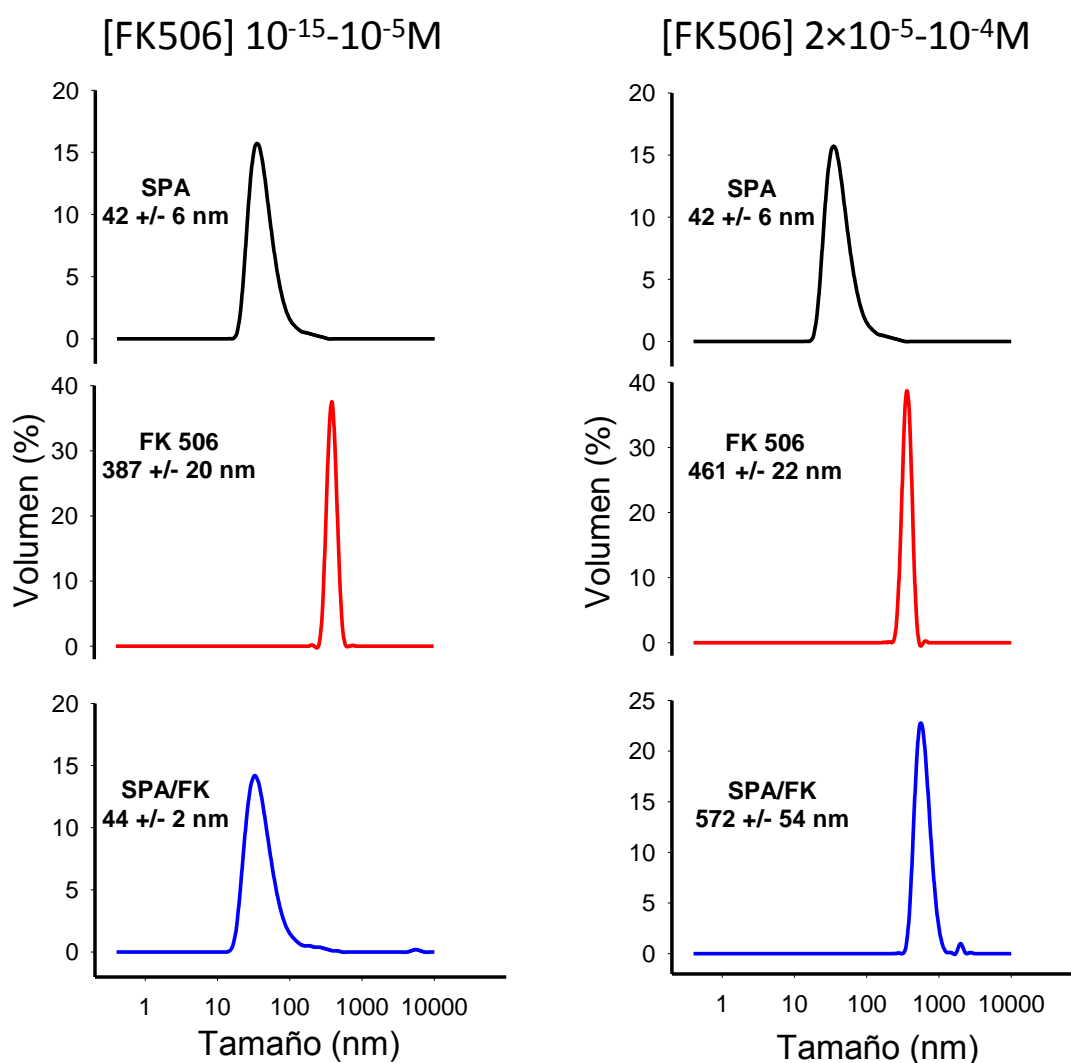


Figura 2: Análisis por dispersión de luz dinámica del diámetro hidrodinámico de la SP-A (12 nM) (arriba), tacrolimus (centro) y la mezcla de ambas moléculas (abajo) en ausencia de calcio. El eje Y representa el volumen relativo de luz dispersada y el eje X el diámetro hidrodinámico de las partículas presentes en la solución. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

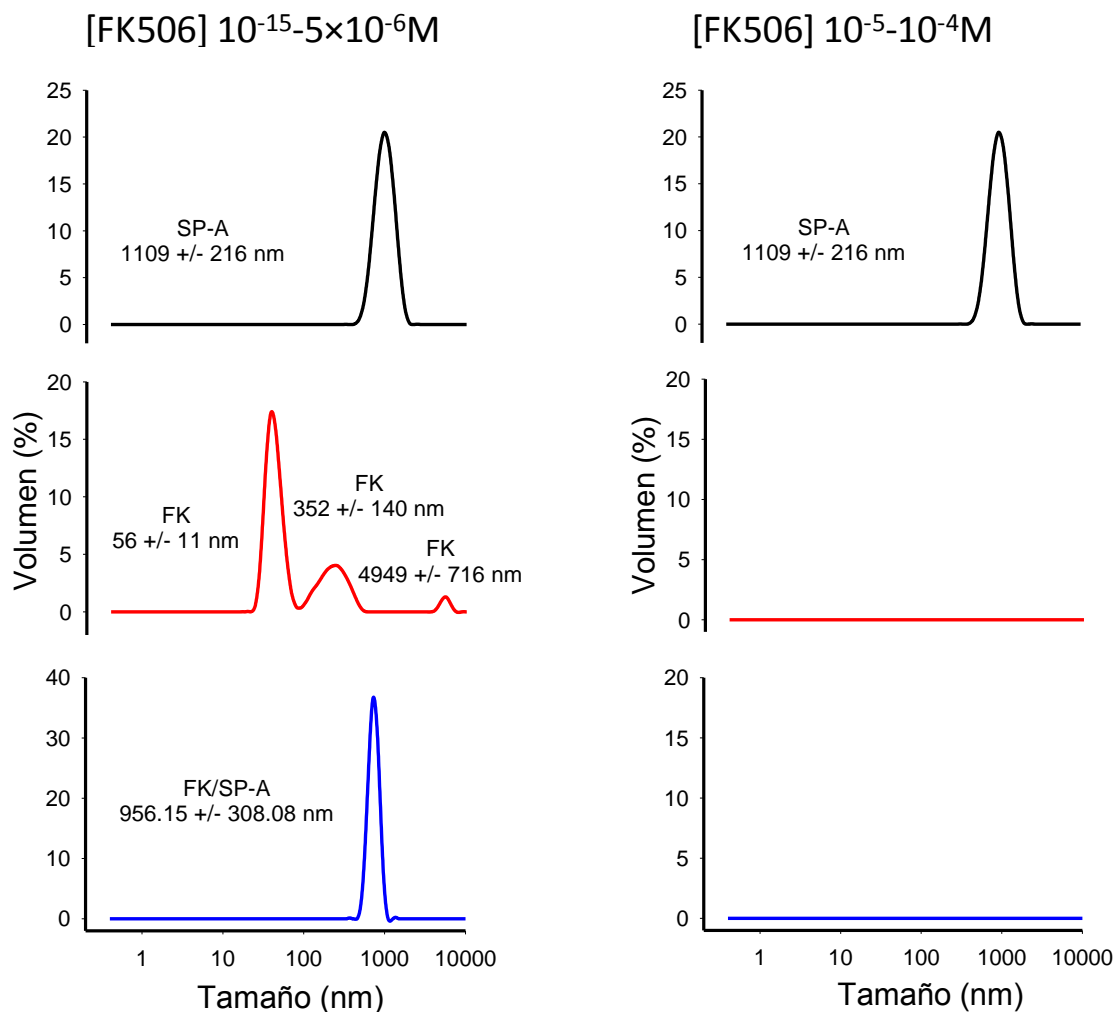


Figura 3: Análisis por dispersión de luz dinámica del diámetro hidrodinámico de la SP-A (12 nM) (arriba), el tacrolimus (centro) y la mezcla de ambas moléculas (abajo) en presencia de 2 mM de calcio. El eje Y representa el volumen relativo de luz dispersada y el eje X el diámetro hidrodinámico de las partículas presentes en la solución. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

La incubación de la SP-A con concentraciones de tacrolimus entre 10^{-15} y 10^{-5} M produjo la desaparición del pico del tacrolimus, observándose un único pico de un diámetro hidrodinámico similar al de la SP-A. Esto parece indicar que la presencia de SP-A en el medio conllevaría la desaparición de los agregados de tacrolimus por unión del fármaco a la proteína. Al incubar la SP-A con concentraciones mayores de tacrolimus, entre 2×10^{-5} y 10^{-4} M, se observó la desaparición de los picos correspondientes a la proteína y a los agregados de tacrolimus y la aparición de un nuevo pico correspondiente a un tamaño hidrodinámico de 572 ± 54 nm. Esto sugiere que, a estas altas concentraciones de tacrolimus, la unión de la proteína no lleva a la

disociación de los agregados, sino a la formación de nuevos agregados formados por SP-A y tacrolimus de diámetro hidrodinámico ligeramente mayor.

La Figura 3 representa los análisis de dispersión de luz dinámica en presencia de calcio de SP-A, tacrolimus y la mezcla SP-A/tacrolimus. En este caso, se obtuvo un pico de dispersión para la SP-A correspondiente a partículas con un diámetro hidrodinámico de 1109 ± 216 nm. Este aumento de tamaño se debe a la autoasociación de SP-A en presencia de calcio. Por otro lado, para el tacrolimus, en un intervalo de concentraciones de entre 10^{-15} y 5×10^{-6} M, se obtuvieron tres picos, siendo el mayoritario el correspondiente a partículas con un tamaño hidrodinámico de 56 ± 11 nm. Al aumentar la concentración de tacrolimus a 10^{-5} M los agregados de tacrolimus precipitan, por lo que no se pudieron detectar.

La incubación de la SP-A con distintas cantidades de tacrolimus, entre 10^{-15} y 5×10^{-6} M, en presencia de calcio produjo un efecto similar al determinado en ausencia de este catión, observándose un único pico correspondiente a un diámetro hidrodinámico similar al obtenido para la SP-A. La precipitación de los agregados de tacrolimus a partir de una concentración 10^{-5} M no permitió estudiar la interacción de la proteína con el fármaco en estas condiciones.

4.1.2. Estudios de unión en soporte sólido

Para caracterizar la unión entre el tacrolimus y la SP-A se determinó la constante de disociación del complejo mediante experimentos de unión en soporte sólido. Para ello se unió el tacrolimus a una placa de poliestireno y posteriormente se incubó con concentraciones crecientes de SP-A biotinilada entre 0 y 150 nM.

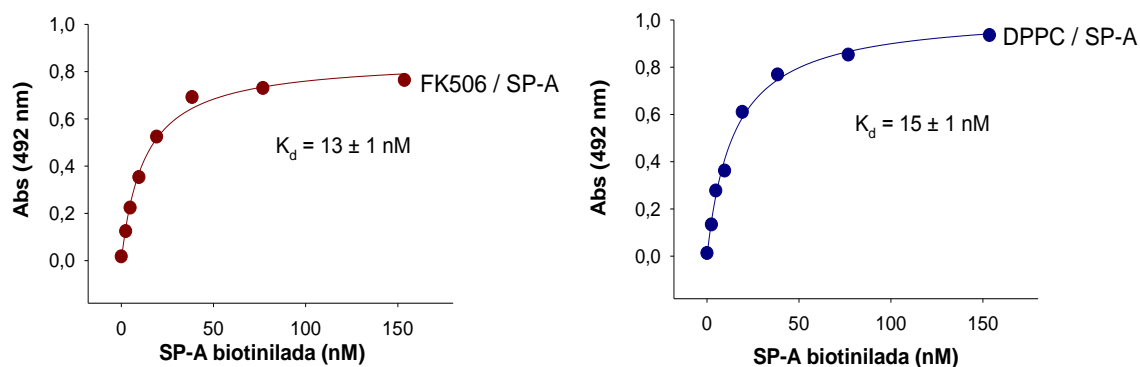


Figura 4: Unión de SP-A a tacrolimus (izquierda) y DPPC (derecha). SP-A se une a tacrolimus y DPPC de forma dosis dependiente. La cantidad de SP-A unida al tacrolimus o la DPPC se determinó con estreptavidina peroxidasa. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

La Figura 4 indica que la SP-A biotinilada se unió a los pocillos de la placa tapizados con tacrolimus de una manera dosis dependiente con una K_d de 13 ± 1 nM. La SP-A no se unió a los pocillos que únicamente contenían el disolvente. La curva de unión obtenida es similar a la encontrada en ensayos de unión de SP-A a DPPC, fosfolípido al que la SP-A se une con alta afinidad, con una K_d de 15 ± 1 nM.

4.2. Efecto del tacrolimus sobre la estructura de la SP-A

4.2.1. Características fluorescentes de la SP-A unida al tacrolimus

La fluorescencia de la SP-A está dominada por la contribución de sus dos residuos de triptófano, localizados en las posiciones 191 y 213 en todas las SP-A de mamíferos estudiados hasta ahora. Estos dos triptófanos están localizados cerca del lugar de unión a calcio, situado en el centro del sitio de unión a azúcares en el dominio globular. Por tanto, los residuos de triptófano de la SP-A son marcadores sensibles a los cambios conformacionales en esta región (Garcia-Verdugo *et al.* 2003).

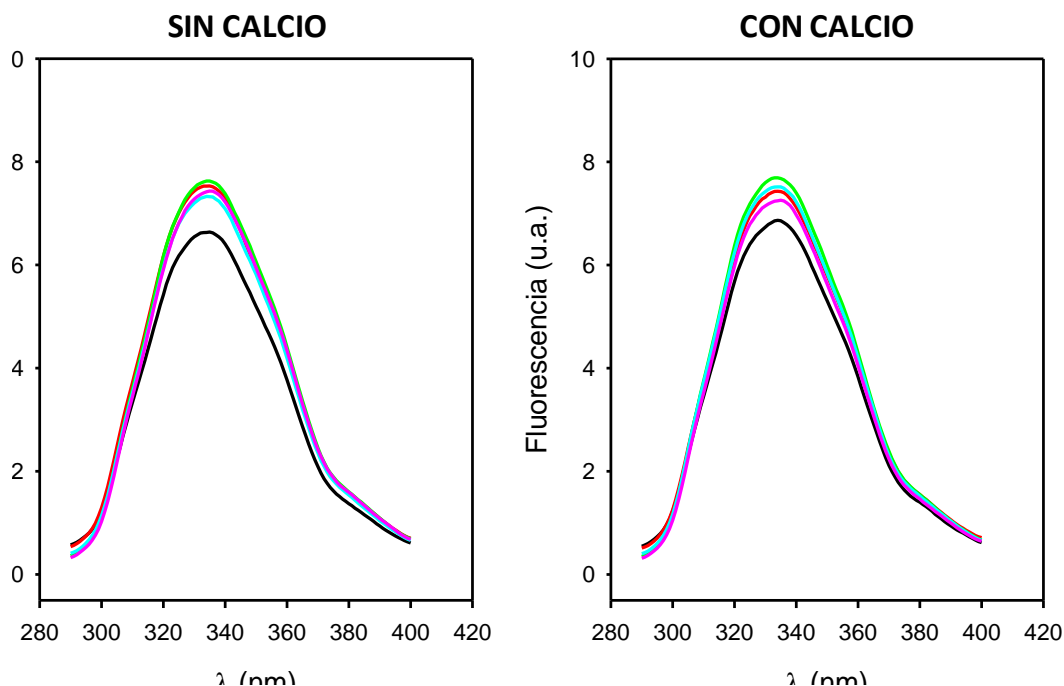


Figura 5: Espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A ($5 \mu\text{g/ml}$, 7.5 nM) en ausencia (—) o presencia de distintas concentraciones de tacrolimus ($0.07 \mu\text{M}$ (—); $0.14 \mu\text{M}$ (—); $0.21 \mu\text{M}$ (—); $0.28 \mu\text{M}$ (—)) a una longitud de onda de excitación de 275 nm . Los experimentos se hicieron en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de 2 mM de calcio. Los resultados mostrados son los representativos de 3 experimentos.

La Figura 5 muestra que el espectro de emisión de fluorescencia de la SP-A en tampón Tris/HCl 5 mM se caracteriza por un máximo de emisión de fluorescencia en torno a los 336 nm y que la adición de 2 mM de calcio produce un desplazamiento del máximo de emisión a longitudes de onda menores, de 336 a 334 nm . Esto indica que la interacción de los iones calcio con SP-A produce un cambio conformacional en la proteína que afecta a la polaridad en el entorno de los residuos de triptófano. La unión de tacrolimus a la SP-A produjo un incremento en la intensidad de fluorescencia de la proteína tanto en ausencia como en presencia de calcio. Este incremento no estuvo acompañado de un desplazamiento espectral del máximo de emisión de fluorescencia.

4.2.2. Espectros de dicroísmo circular de la SP-A unida al tacrolimus

Para estudiar el efecto del tacrolimus en la estructura secundaria de la SP-A se llevaron a cabo estudios de dicroísmo circular a 25°C . Los espectros de dicroísmo circular de la SP-A humana se caracterizan por un máximo de elipticidad molar negativa a 207 nm y un hombro a 220 nm (García-Verdugo *et al.* 2003). La Figura 6 indica que el espectro

de dicroísmo circular de la SP-A en presencia de distintas concentraciones de tacrolimus no presentó diferencias significativas con respecto al espectro dicroico de la SP-A sola.

La estimación del contenido en estructura secundaria de la proteína se realizó tras la desconvolución de los espectros dicroicos en cuatro componentes simples (α -hélice, lámina- β , giro- β y ovillo estadístico). La Tabla 1 muestra que la adición de concentraciones crecientes de tacrolimus no modificó significativamente la estructura secundaria de la proteína.

	α -hélice	Giro β	Lámina β	Ovillo estadístico
SP-A	$15 \pm 2 \%$	$25 \pm 5 \%$	$17 \pm 0.04 \%$	$33 \pm 1 \%$
+ 0.1 μM FK	$14 \pm 1 \%$	$23 \pm 5 \%$	$20 \pm 1 \%$	$42 \pm 5 \%$
+ 0.5 μM FK	$14 \pm 2 \%$	$23 \pm 5 \%$	$20 \pm 1 \%$	$38 \pm 1 \%$
+ 1 μM FK	$13 \pm 0.9 \%$	$17 \pm 3 \%$	$21 \pm 1 \%$	$42 \pm 0.9 \%$

Tabla 1: Contenido de estructura secundaria de la SP-A en ausencia y presencia de distintas concentraciones de tacrolimus. El resultado mostrado es el representativo de tres experimentos.

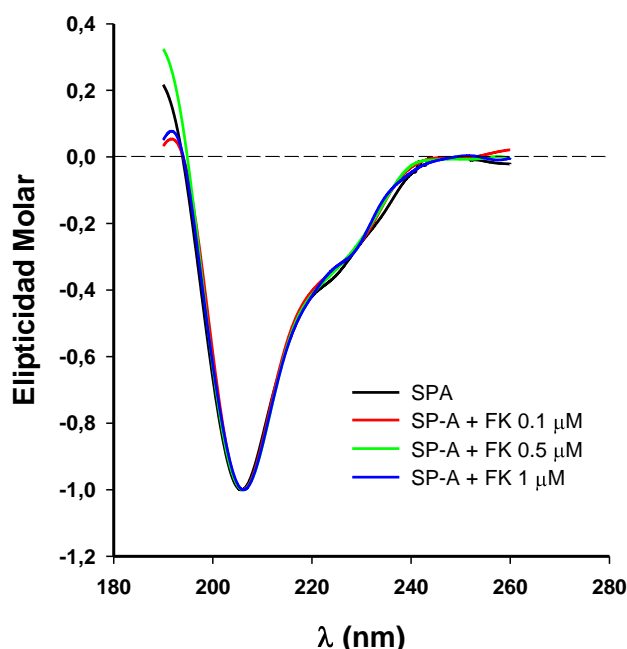


Figura 6: Espectros de dicroísmo circular a 25 °C de la SPA (80 μ g/ml; 123 nM) en ausencia (—) y presencia de distintas concentraciones de tacrolimus (0.1 μ M (—); 0.5 μ M (—); 0.1 μ M (—)). El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

4.3. Efecto del tacrolimus sobre las propiedades de la SP-A

4.3.1. Autoasociación de la SP-A

Una vez caracterizados la interacción entre el tacrolimus y la SP-A y el efecto del fármaco en la estructura secundaria de la proteína, se estudió si la unión del tacrolimus modificaba la capacidad de la SP-A de autoasociarse en presencia de calcio.

La Figura 7 muestra cómo en presencia de una concentración de tacrolimus de 0.14 μM aumentó la autoasociación de la SP-A inducida por calcio. Un aumento en la concentración de tacrolimus (hasta 1.4 μM) produjo tanto un aumento en la autoasociación de la proteína en presencia de calcio como una inhibición casi total de la reversión de la autoasociación de la SP-A al añadir EDTA, quelante de cationes divalentes.

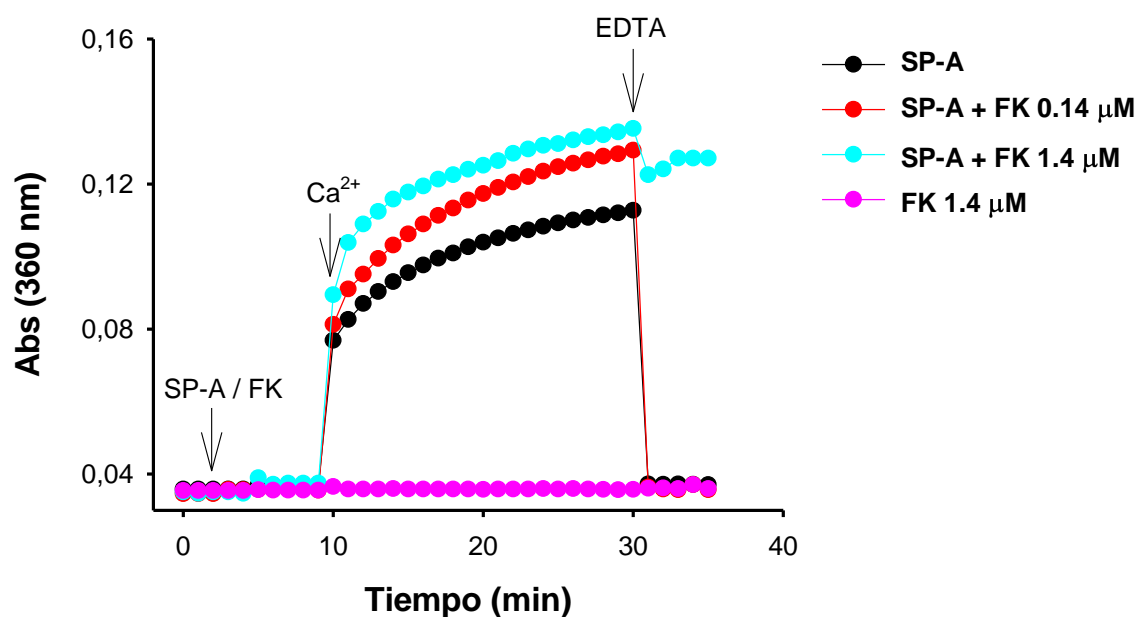


Figura 7: Cinética de autoasociación a 25 °C de la SP-A (50 $\mu\text{g/ml}$; 75 nM) dependiente de calcio en ausencia (●) o presencia de distintas concentraciones de tacrolimus (0.14 μM (●); 1.4 μM (●)). (●) representa la cinética realizada sólo con el tacrolimus. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

4.3.2. Agregación de vesículas de fosfolípidos

La SP-A es capaz de unirse a fosfolípidos y de inducir su agregación de una forma dependiente de calcio, propiedad que parece estar relacionada con su modulación de las

propiedades biofísicas del surfactante pulmonar. Los resultados presentados en la Figura 8 indican que la unión del tacrolimus a la SP-A a cualquiera de las concentraciones estudiadas dio lugar a un aumento en la capacidad de la proteína de agregar vesículas de DPPC/POPG en presencia de calcio. Además, y al igual que ocurría en la autoasociación de la SP-A en presencia de calcio, el tacrolimus evitó parcialmente la reversión de la agregación de la proteína al añadir EDTA. Dado que el tacrolimus, en ausencia de la SP-A, no fue capaz de agregar vesículas aumento de agregación ha de deberse exclusivamente a la unión del fármaco a la proteína.

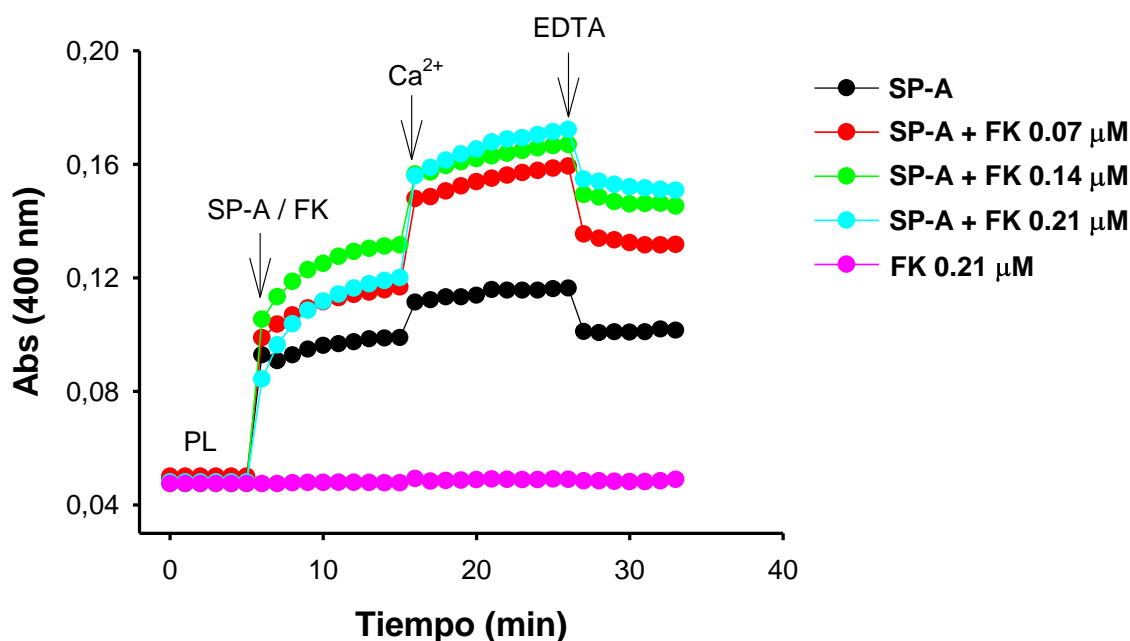


Figura 8: Cinética de agregación a 25 °C de vesículas de DPPC/POPG (relación en peso 8:2) inducida por SP-A (8 μg/ml; 12 nM; relación en peso fosfolípido/SP-A 10:1) en ausencia (●) o presencia de distintas concentraciones de tacrolimus (0.07 μM (●); 0.14 μM (●); 0.21 μM (●)). (●) representa la cinética sólo con el tacrolimus. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

Para comprobar si el aumento en la agregación de vesículas de fosfolípidos mediada por SP-A fue debido a un cambio en la afinidad de la proteína por los fosfolípidos inducida por tacrolimus se realizó un ensayo de unión en soporte sólido para determinar la constante de disociación entre la DPPC y la SP-A en presencia de una concentración de tacrolimus de 0.1 μM.

La Figura 9 indica que la presencia del tacrolimus afectó ligeramente a la unión entre la SP-A y la DPPC. Así, se obtuvo una K_d para la unión DPPC/SP-A en ausencia de

tacrolimus de 15 ± 1 nM y, en presencia de una concentración de tacrolimus de $0.1 \mu\text{M}$, una K_d de 30 ± 7 nM. Estos resultados indican que el efecto del tacrolimus de aumentar la capacidad de SP-A de inducir la agregación de vesículas lipídicas no se debe a una mayor afinidad de la SP-A por los lípidos por lo que podría deberse a un aumento de la capacidad de la SP-A de autoagregar.

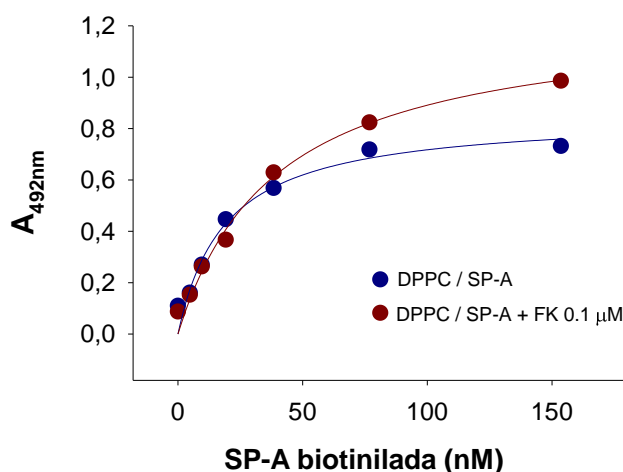


Figura 9: Cinéticas de unión DPPC/SP-A en ausencia (●) o presencia de una concentración de tacrolimus de $0.1 \mu\text{M}$ (●). El experimento se realizó pegando una cantidad fija de DPPC ($50 \mu\text{M}$) a un soporte sólido, y posteriormente incubándolo con concentraciones crecientes de SP-A biotinilada en ausencia o presencia de tacrolimus. La cantidad de SP-A unida a la DPPC se determinó con estreptavidina peroxidasa. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

4.1.2. Agregación de LPS rugoso

El lipopolisacárido bacteriano es el componente mayoritario de la hemicapa externa de la membrana externa de la pared celular de los microorganismos Gram negativos y es uno de los principales responsables de desencadenar una potente respuesta inflamatoria en el huésped, tanto local como sistémica (Bosshart and Heinzelmann 2007). La SP-A se une al LPS rugoso a través del lípido A y es capaz de inducir su agregación en presencia de calcio (Van Iwaarden *et al.* 1994) (Garcia-Verdugo *et al.* 2005).

La Figura 10 indica que la unión de tacrolimus a SP-A a cualquiera de las concentraciones estudiadas produjo un aumento en la capacidad de la SP-A de agregar LPS en presencia de calcio. Al contrario de lo que ocurría con la agregación de vesículas de fosfolípidos, la adición de EDTA produjo en todos los casos una reversión

completa de la agregación de LPS. Como se observó en la agregación de vesículas, el tacrolimus en ausencia de SP-A no fue capaz de agregar LPS, lo que sugiere que el aumento de agregación de LPS inducida por SP-A en presencia del tacrolimus respecto al que se produjo en ausencia del fármaco se debió exclusivamente al efecto del tacrolimus sobre la proteína.

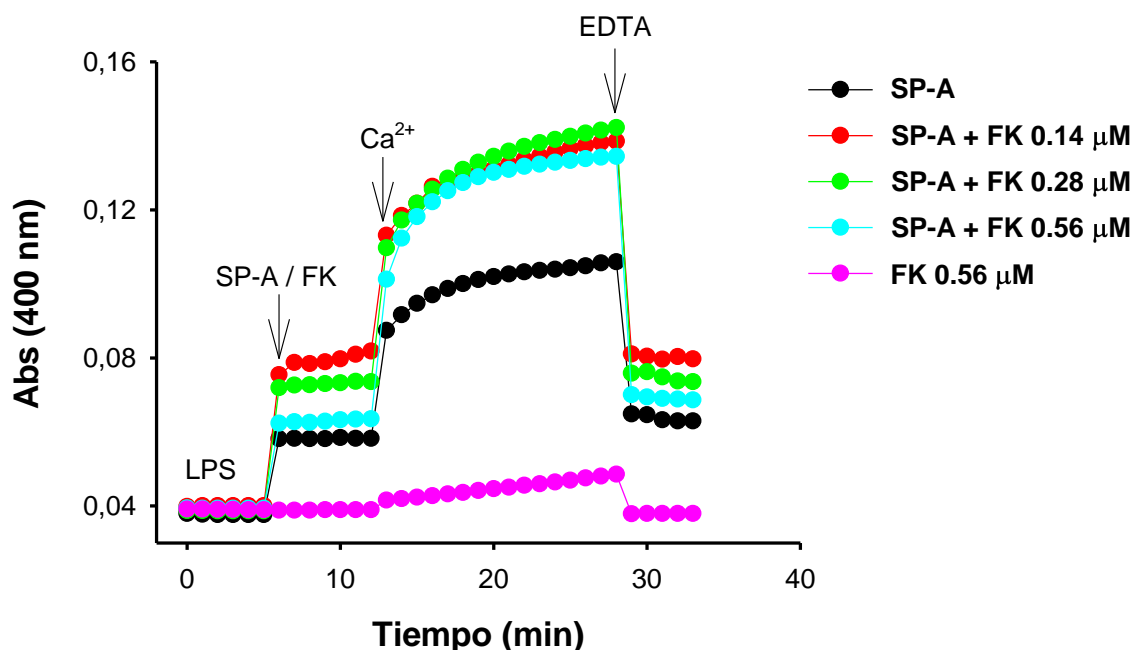


Figura 10: Cinética de agregación de LPS rugoso (*Salmonella minnesota*, serotipo Re-LPS) inducida por SP-A (20 μg/ml; 30 nM; relación en peso LPS/SP-A 2:1) en ausencia (●) o presencia de distintas concentraciones de tacrolimus (0.14 μM (●); 0.28 μM (●); 0.56 μM (●)). (●) representa la cinética sólo con el tacrolimus. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

4.4. Efecto del tacrolimus sobre las funciones de la SP-A

4.4.1. Efecto de la SP-A sobre la adsorción interfacial de membranas de surfactante

Dado que una de las funciones de la SP-A es promover la adsorción del surfactante pulmonar, se estudió el efecto de la unión del tacrolimus a la proteína sobre dicha función. Para ello se incubó la SP-A con distintas concentraciones de tacrolimus y se midió la presión superficial en función del tiempo. El proceso de adsorción interfacial consta de dos etapas, el transporte del material desde la hipofase donde es inyectado hasta la interfase aire líquido y la expansión del material a lo largo de la interfase aire-líquido.

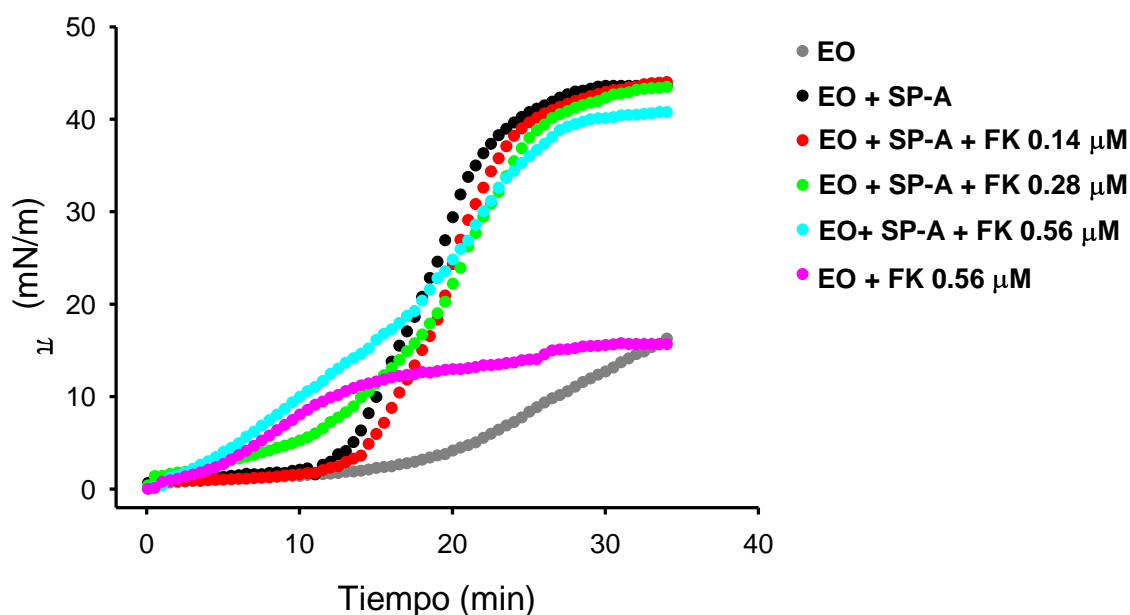


Figura 11: Cinéticas de adsorción interfacial de membranas de surfactante pulmonar porcino (400 nmoles de fosfolípidos; 67 nmoles de fosfolípidos/ml) conteniendo SP-B y SP-C. los experimentos se llevaron a cabo en ausencia (●) o presencia de SP-A (5 $\mu\text{g/ml}$; 12 nM) y sin (●) o con distintas concentraciones de tacrolimus (0.14 μM (●); 0.28 μM (●); 0.56 μM (●)). (●) representa la cinética sólo con el tacrolimus en ausencia de SP-A. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

La Figura 11 muestra que, a la concentración estudiada (67 nmoles de fosfolípido/ml), las membranas del surfactante pulmonar porcino conteniendo SP-B y SP-C se adsorben muy lentamente a la interfase aire-líquido. La presencia de la SP-A en el tampón incrementó significativamente la velocidad de transporte y expansión del material surfactante en la interfase aire-líquido, alcanzándose en 30 minutos valores próximos a la presión de equilibrio, que es de 47 mN/m. La incubación de la SP-A con concentraciones de tacrolimus de 0.14 μM dio lugar a una cinética de adsorción interfacial de las membranas de surfactante pulmonar prácticamente idéntica a la de la SP-A sola. Un pequeño aumento en la concentración de tacrolimus supuso una cinética con una reducción del tiempo de retardo, esto es, del tiempo que tardan las membranas en alcanzar la interfase aire-líquido. Para dilucidar si este efecto fue debido a la unión del tacrolimus a la SP-A o a la presencia del fármaco en la hipofase se realizó un ensayo inyectando una concentración de tacrolimus de 0.56 μM en ausencia de SP-A. Los resultados indican que la presencia de tacrolimus en la hipofase produjo una disminución del tiempo de retardo no acompañado de una mejor expansión de las

membranas de surfactante a lo largo de la superficie interfacial, por lo que no alcanzaron presiones superficiales mayores que las logradas con las concentraciones de surfactante utilizadas en ausencia de tacrolimus. Estos resultados reflejan que la presencia de tacrolimus no altera las funciones de la SP-A relacionadas con la disminución de la tensión superficial y que incluso favorece la difusión de los fosfolípidos a la interfase.

4.4.2. Actividad antimicrobiana de la SP-A

4.4.2.1. Inhibición del crecimiento bacteriano

Otra de las funciones de la SP-A es su actividad microbicida. En primer lugar se estudió si el fármaco tenía algún efecto sobre la capacidad de la SP-A de inhibir el crecimiento bacteriano. Para ello se utilizaron bacterias de una cepa de laboratorio de *Escherichia coli*, las J5, las cuales presentan un fenotipo rugoso (Rc-LPS).

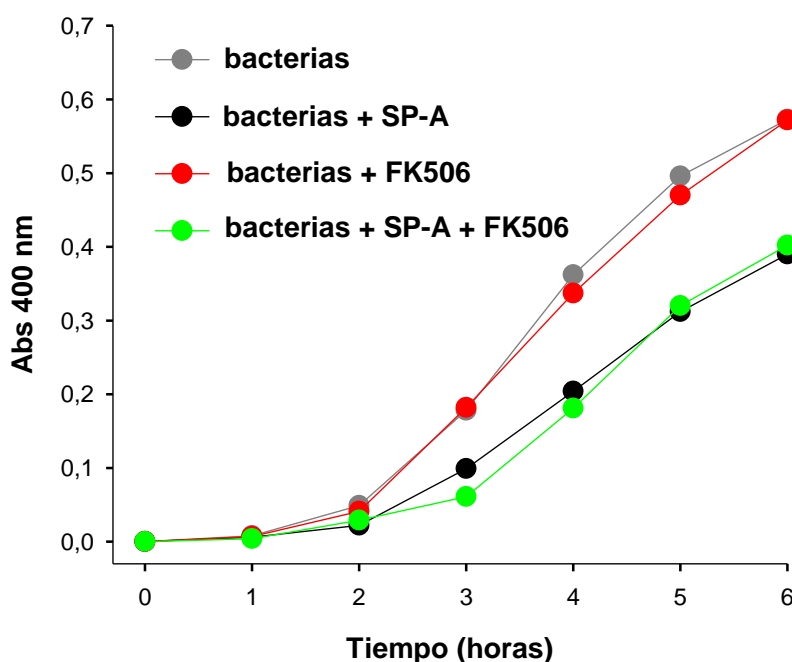


Figura 12: Cinéticas de crecimiento exponencial de bacterias *Escherichia coli*, cepa J5, en ausencia (●) o presencia de SP-A (25 μ g/ml; 37.5 nM) incubada sin (●) o con una concentración de 0.5 μ M de tacrolimus (●). (●) representa la cinética sólo con el tacrolimus. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos.

La Figura 12 muestra que una concentración de SP-A de 25 $\mu\text{g/ml}$ fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Cuando se incubaron las bacterias con una concentración de tacrolimus de 0.5 μM no se observaron cambios significativos en el crecimiento del cultivo bacteriano respecto al control. La incubación de las bacterias con SP-A y tacrolimus no supuso una mayor inhibición del crecimiento con respecto a las bacterias incubadas únicamente con SP-A.

4.4.2.2. Muerte bacteriana

Además, se estudió el efecto de del tacrolimus sobre la muerte bacteriana inducida por la SP-A. La Figura 13 indica que, en presencia de SP-A, la viabilidad bacteriana disminuyó hasta un 40 % a los 30 minutos y hasta un 20 % a las 3 horas. Cuando se incubaron las bacterias con una concentración de tacrolimus de 0.5 μM no se observaron cambios significativos en la viabilidad bacteriana con respecto al control. la incubación de las bacterias con el fármaco y la proteína no supuso una mayor disminución de la viabilidad con respecto a las bacterias incubadas únicamente con SP-A.

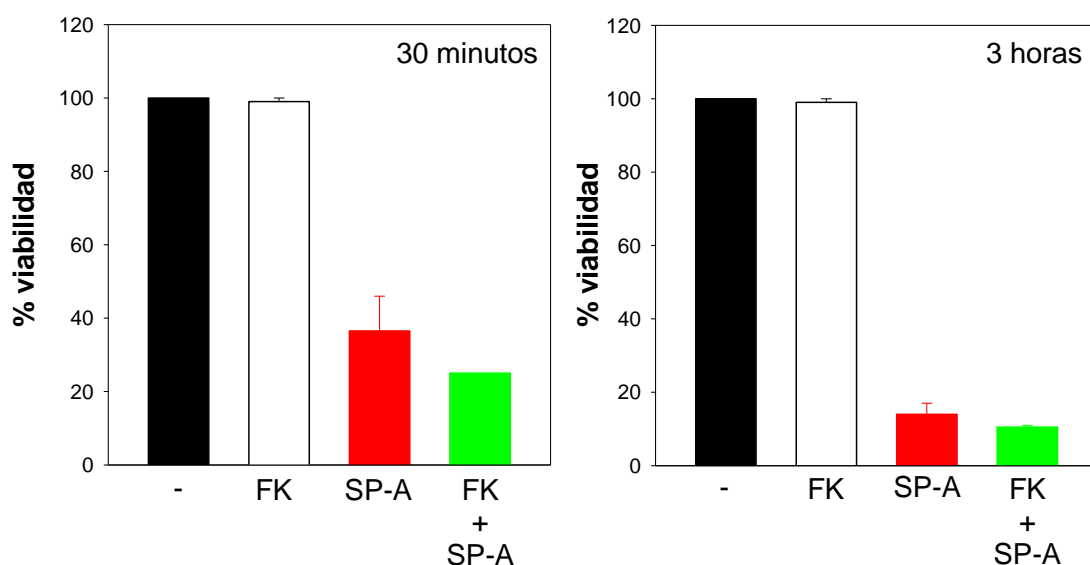


Figura 13: Viabilidad a 30 minutos (izquierda) o 3 horas (derecha) de bacterias *Escherichia coli*, cepa J5, en ausencia (barras negras) o presencia de tacrolimus (0.5 μM) (barras blancas), SP-A (25 $\mu\text{g/ml}$; 37.5 nM) o ambas moléculas (barras verdes). Los resultados se expresaron como % respecto al control sin tratar. El resultado mostrado es la media \pm desviación estándar de tres experimentos.

4.4.3. Actividad inmunosupresora de la SP-A

Una de las funciones inmunomoduladoras de la SP-A consiste en suprimir la proliferación de los linfocitos T mediante la inhibición de la secreción de interleuquina 2. Parece que esta unión estaría mediada, al menos en parte, por la unión de la SP-A a su receptor, SPR210 (Borron *et al.* 1998). Dado que esta propiedad es, precisamente, el principal mecanismo de acción del tacrolimus como inmunosupresor, se quiso estudiar si la unión de fármaco y proteína afectaba a las propiedades inmunosupresoras de cada uno de las dos moléculas por separado. Las propiedades inmunosupresoras del tacrolimus, de la SP-A o de ambas moléculas se determinó midiendo la cantidad de IL-2 secretada al medio por células Jurkat estimuladas con PHA y PMA durante 48 horas en presencia de distintas concentraciones de tacrolimus, SP-A o ambas moléculas.

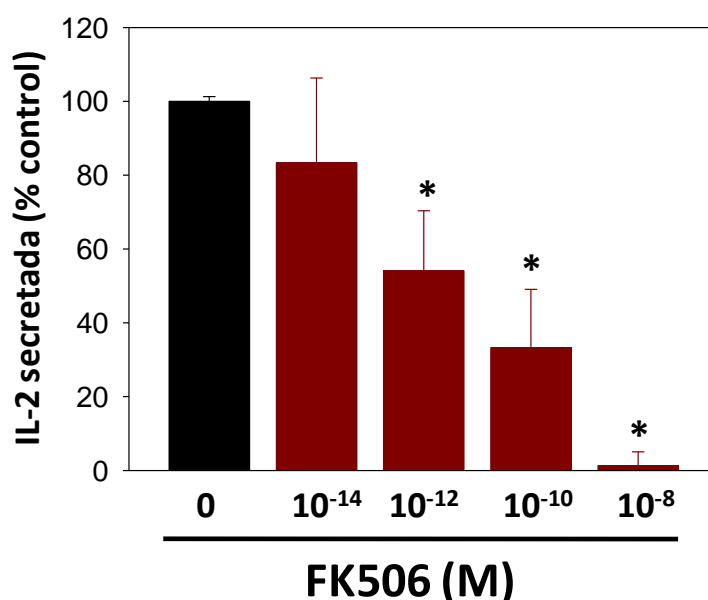


Figura 14: Efecto de distintas concentraciones de tacrolimus sobre la secreción de IL-2 en células Jurkat estimuladas con PHA (1 $\mu\text{g/ml}$) y PMA (10 nM) durante 48 horas. Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células estimuladas pero no tratadas con el fármaco. * $p < 0.05$ vs control positivo.

La Figura 14 indica que el tacrolimus disminuyó, a partir de concentraciones de 10^{-12} M, la secreción de IL-2 en células Jurkat estimuladas con PHA y PMA durante 48 horas. La Figura 15 muestra que la coincubación de una concentración de tacrolimus de 10^{-14} M, por lo tanto sin efecto inmunosupresor, con una concentración de SP-A con efecto inmunosupresor (15 $\mu\text{g/ml}$) incrementó el efecto inmunosupresor de la proteína.

Esto indica que la unión de pequeñas cantidades de fármaco a la proteína potencia la capacidad inmunosupresora de la mezcla. Esto podría deberse a que la unión del fármaco a la proteína produce la desagregación de tacrolimus (Figura 2) lo que puede facilitar su entrada en la célula a través de la membrana celular, su unión a la FKBP y la acción de tacrolimus/FKBP sobre la calcineurina.

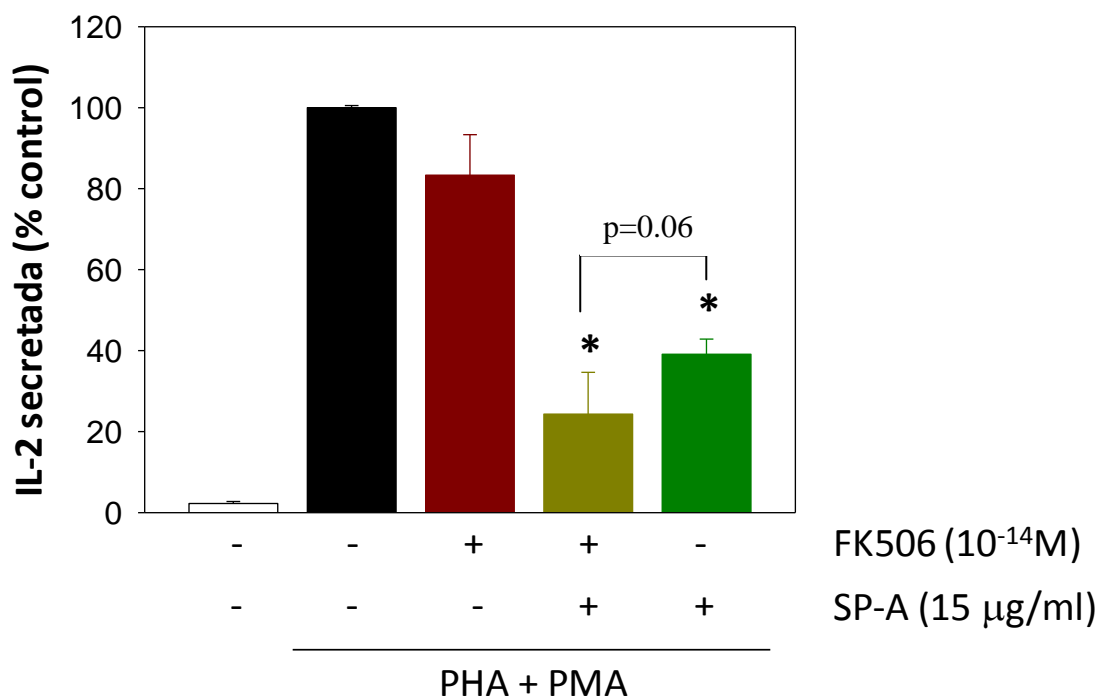


Figura 15: Efecto de tacrolimus, SP-A o ambas moléculas sobre la secreción de IL-2 en células Jurkat estimuladas con PHA (1 μ g/ml) y PMA (10 nM) durante 48 horas. Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células estimuladas pero no tratadas con el fármaco, la proteína o ambas moléculas. * $p < 0.05$ vs control positivo.

La Figura 16 indica que la coincubación de tacrolimus a una concentración de 10^{-10} M, a la que se observa un efecto inmunosupresor del fármaco, con distintas concentraciones de SP-A, entre 2.5 y 15 μ g/ml, produjo un efecto mayor que los efectos inmunosupresores de cada una de las dos moléculas por separado. Esto refleja que las propiedades inmunosupresoras de fármaco y proteína no sólo no se vieron afectadas negativamente sino que la unión entre ambas moléculas potenció la acción inmunosupresora de ambas.

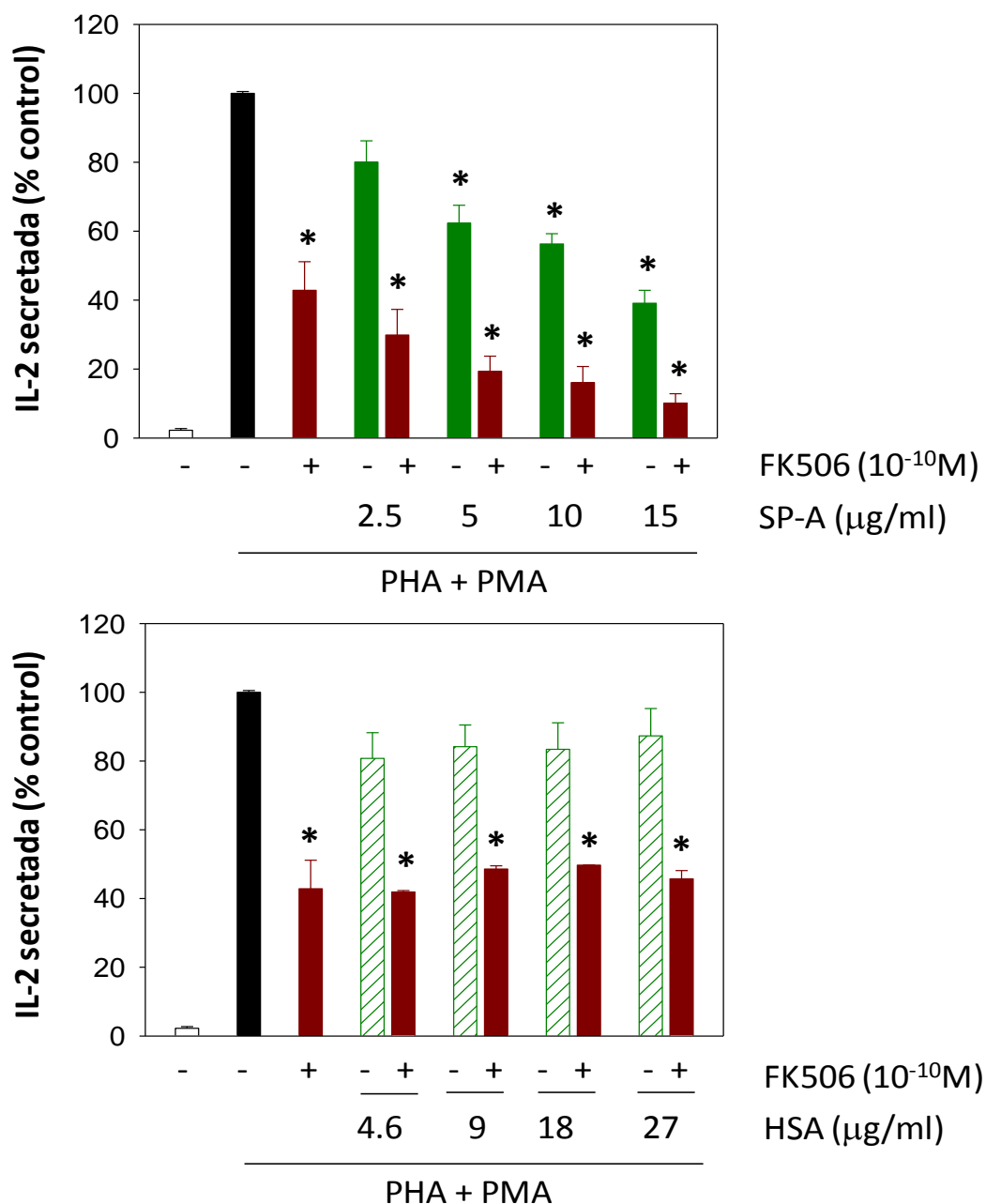


Figura 16: Efecto de la coincubación de una concentración de tacrolimus de 10^{-10} M con varias concentraciones de SP-A (arriba) o albúmina (abajo) sobre la secreción de IL-2 en células Jurkat estimuladas con PHA (1 µg/ml) y PMA (10 nM) durante 48 horas. Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células estimuladas pero no tratadas. * $p < 0.05$ vs control positivo.

La Figura 16 también muestra que la coincubación de tacrolimus con albúmina de suero bovino, proteína a la que el fármaco también se une con alta afinidad pero que no presenta actividad inmunosupresora, no afectó a la actividad inmunosupresora del

tacrolimus. Además, cuando en vez de coincubar el tacrolimus con la albúmina, se preincubaron ambas moléculas durante 5 minutos antes de incorporarse en los pocillos, el efecto inmunosupresor del fármaco se reduce (Figura 17). Por el contrario, la preincubación del tacrolimus y la SP-A produjo exactamente el mismo efecto que el encontrado con la coincubación de ambas moléculas, como se muestra en la Figura 17.

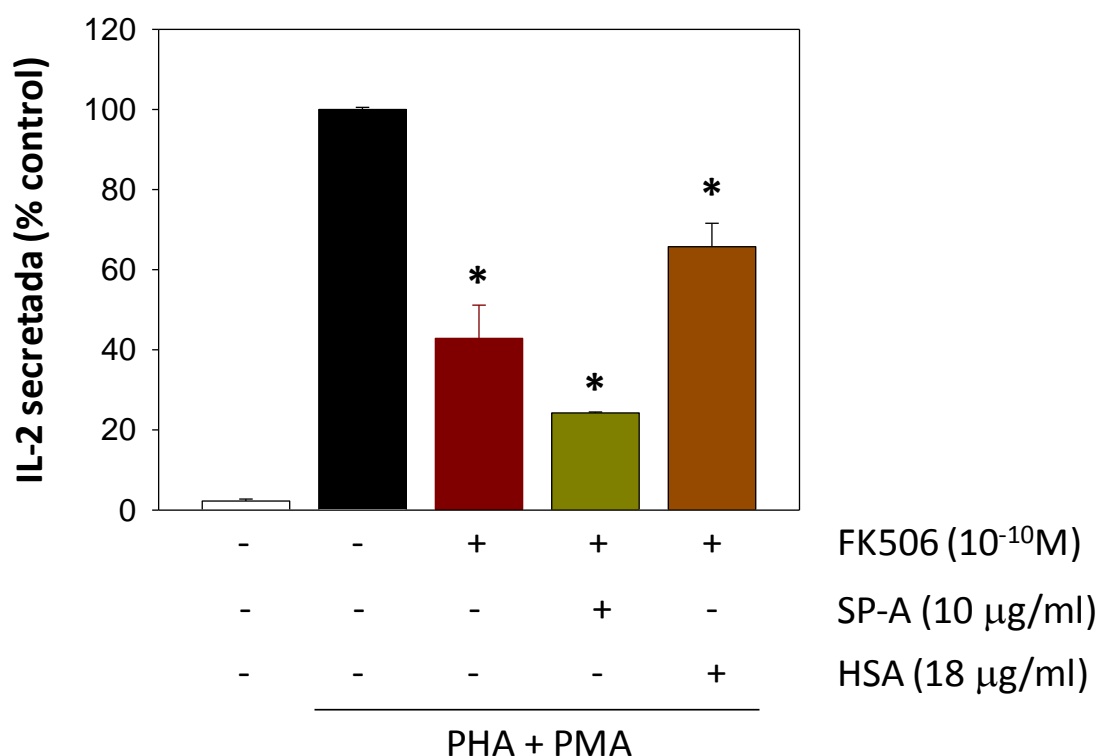


Figura 17: Efecto de la preincubación de tacrolimus con SP-A o albúmina sobre la secreción de IL-2 en células Jurkat estimuladas con PHA (1 µg/ml) y PMA (10 nM) durante 48 horas. Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células estimuladas pero no tratadas. * $p < 0.05$ vs control positivo.

5. DISCUSIÓN

Una de las potenciales administraciones del tacrolimus para el tratamiento de enfermedades respiratorias es la nebulización directa del fármaco al pulmón. Dado que la proteína mayoritaria presente en el fluido alveolar es la SP-A, en este capítulo se ha caracterizado la unión de ambas moléculas y se ha estudiado cómo afecta esta interacción a las características estructurales de la proteína, así como a sus propiedades de autoasociación, agregación de vesículas de fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar y LPS. Por último, se ha analizado el efecto del tacrolimus sobre las

funciones más importantes de la SP-A: 1) promover la adsorción interfacial del surfactante; 2) proteger el alveolo de patógenos actuando como proteína microbicida; y 3) proteger el alveolo de una respuesta inflamatoria exacerbada mediante la inmunosupresión, entre otros, de linfocitos T.

A partir de ensayos de unión en soporte sólido se ha determinado que la constante de disociación, K_d , para el complejo tacrolimus/SP-A es de 13 ± 1 nM (Figura 4). Este valor coincide con el encontrado, mediante un ensayo de anisotropía de fluorescencia, para la unión de la SP-A a un derivado dansilado de tacrolimus (FK-DNS) (10 ± 5 nM) (Canadas *et al.* 2005), lo que indica que la derivatización del fármaco en el C22 no modifica la afinidad de éste por la SP-A, al contrario de lo que ocurre con la unión de FK-DNS a FK-BP12 (Canadas *et al.* 2005). La estructura cristalina del complejo FK506/FK-BP12 indica que la región comprendida entre el C15 y el C23 (Figura 18), denominada bucle efector, de la molécula de tacrolimus se encuentra en contacto con el disolvente (Van Duyne *et al.* 1991). Debido a la naturaleza hidrofóbica del grupo dansilo, cuando la molécula de FK-DNS se une a FK-BP12, el fluoróforo colapsa sobre el anillo macrólido alterando la estructura del fármaco y, por tanto, inhibiendo parcialmente la unión de éste a su inmunofilina (Canadas *et al.* 2005). Por otro lado, nuestro grupo ha determinado que la unión de FK-DNS a SP-A produce un desplazamiento a longitudes de onda menores del máximo de emisión de fluorescencia de 49 nm, mientras que la unión de FK-DNS a FK-BP12 produce un desplazamiento de 30 nm (Canadas *et al.* 2005). Esto sugiere que el entorno de la sonda fluorescente es menos polar cuando el fármaco se une a SP-A que cuando se une a su inmunofilina. La mayor hidrofobicidad del entorno del grupo dansilo en presencia de SP-A evitaría el colapso del fluoróforo sobre el anillo macrólido, lo que explicaría que la derivatización del fármaco no afecte a su afinidad por la proteína e indicaría que el fármaco se une a la SP-A por el bucle efector. Por otro lado, la comparación de la constante de disociación obtenida para el complejo tacrolimus/SP-A con la obtenida a partir de ensayos cromatográficos para la unión del fármaco a su inmunofilina, 0.4 nM (Bierer *et al.* 1990) y con la obtenida para la unión de SP-A a DPPC, 15 ± 1 nM (Figura 4) indica que la unión de tacrolimus a SP-A es de alta afinidad. Además de en soporte sólido, también se realizaron estudios de unión en solución mediante la técnica de dispersión de luz dinámica. Estos estudios demuestran que concentraciones tan bajas de fármaco como 10^{-15} M se encuentran formando agregados en solución debido a su alta hidrofobicidad y

que la presencia de SP-A en la solución produce una desaparición de los agregados de tacrolimus por unión a la proteína.

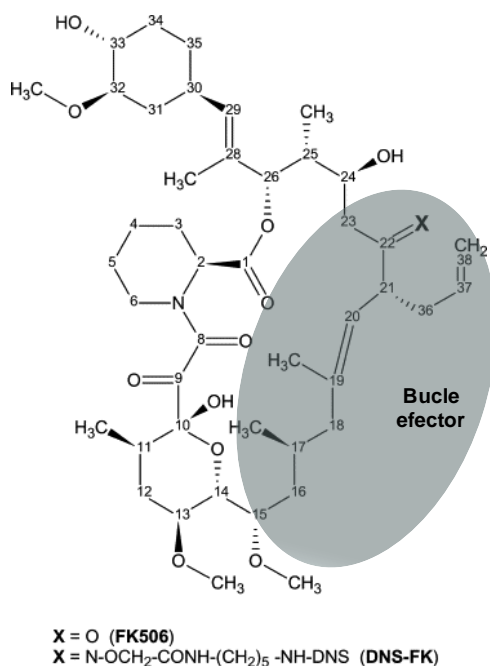


Figura 18: Estructura química del tacrolimus (FK506) y de su derivado fluorescente (DNS-FK). El círculo azul señala la región del fármaco conocida como bucle efector.

Para estudiar si la unión entre el tacrolimus y la SP-A afectaba a las características estructurales de la proteína se realizaron estudios de dicroísmo circular y de fluorescencia intrínseca. Los resultados de dicroísmo reflejan la ausencia de cambios significativos en la estructura secundaria de la proteína cuando se encuentra unida al fármaco (Figura 6, Tabla 1). Sin embargo, la presencia de tacrolimus produjo un incremento en la intensidad de fluorescencia de los residuos de triptófano de la proteína que no estuvo acompañado de un desplazamiento espectral del máximo de emisión de fluorescencia (Figura 5). Esto podría reflejar un cambio conformacional en la proteína que disminuyera la desactivación de la fluorescencia de los residuos de triptófano producida por grupos polarizables de la propia proteína. No obstante, este cambio conformacional no estaría acompañado de cambios en la polaridad del entorno de los residuos de triptófano. Estos resultados son similares a los encontrados en los espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A unida a la DPPC (Casals *et al.* 1993). Dado que el sitio de unión de la SP-A con la DPPC parece encontrarse en el dominio globular (Palaniyar *et al.* 1998) es lógico pensar que el tacrolimus podría estar interactuando con

la SP-A a través de esta región. Sin embargo, los estudios de unión en soporte sólido demuestran que la unión de tacrolimus a la SP-A afecta muy poco a la afinidad de ésta por la DPPC (Figura 9), por lo que los sitios de unión de DPPC y tacrolimus a la proteína deben ser distintos. Además, estudios de transferencia de energía realizados por nuestro grupo para determinar el sitio de unión de tacrolimus a la SP-A (Canadas *et al.* 2005) demostraron que no se detectó transferencia de energía entre los residuos de triptófano de la SP-A y el grupo dansilo de FK-DNS. Asumiendo una distancia de Förster, R_0 , para el par triptófano-dansilo de 21 Å (Wu and Brand 1994) y considerando que para que no haya transferencia de energía la distancia entre donador y aceptor ha de ser $\geq 2R_0$, el sitio de unión del tacrolimus a la SP-A se encontraría a partir de una región del dominio del cuello rica en aminoácidos ácidos (Asp 84, Glu 85 y Glu 86) según la estructura cristalográfica determinada por (Head *et al.* 2003). Dada la naturaleza hidrofóbica del tacrolimus es poco probable que éste pudiera unirse a dicha región. Como el dominio N terminal consta sólo de 7-10 aminoácidos, nuestros resultados parecen indicar que el sitio de unión del tacrolimus a la SP-A podría encontrarse en el dominio de colágeno. Si esto fuera así se explicaría por qué la unión del fármaco a la proteína no produjo modificaciones en el espectro dicróico de la misma, ya que la contribución de la hélice de colágeno al espectro de dicroísmo de la proteína es mínima en comparación con las contribuciones de los distintos tipos de estructuras secundarias principales (α -hélice, láminas y giros β y ovillo estadístico) (Ruano *et al.* 1998). La unión de tacrolimus en el dominio de colágeno de SP-A podría modificar la torsión de las hélices de colágeno de manera similar a la descrita para los iones calcio y sodio (Palaniyar *et al.* 1998). Esto produciría una aproximación de los dominios globulares que podría implicar una ligera reorganización en la estructura de los mismos que redujera la desactivación de la fluorescencia de los residuos de triptófano, con el consecuente aumento en la intensidad de fluorescencia.

Los cambios en la estructura de la SP-A debidos a la unión del tacrolimus aumentaron la capacidad de la proteína de autoasociarse (Figura 7), agregar vesículas de fosfolípidos (Figura 8) y agregar LPS (Figura 10). Estas tres propiedades dependen de la estabilidad de la hélice de colágeno (Ruano *et al.* 2000) (Haagsman *et al.* 1990) (Ross *et al.* 1991) (Garcia-Verdugo *et al.* 2002), por lo que es posible que el cambio en la estructura de la proteína inducido por la unión del fármaco favorezca la interacción de la SP-A con otras moléculas de SP-A así como con vesículas lipídicas y agregados de Re-LPS. Aunque se

desconoce el mecanismo por el cual la SP-A se autoasocia en presencia de calcio, se sabe que los iones calcio producen una aproximación de las cabezas globulares del octadecámero de SP-A y disminuyen la torsión de la hélice de colágeno (Palaniyar *et al.* 1998), por lo que es posible que estos cambios en la estructura de la proteína faciliten su autoasociación. La unión de tacrolimus a la SP-A podría facilitar y estabilizar los cambios estructurales inducidos por los iones calcio, lo que impediría su reversión por EDTA. Por otro lado, el mecanismo de agregación de vesículas inducido por SP-A parece estar relacionado con la capacidad de autoasociación de la proteína (Haagsman *et al.* 1990) (Casals and Garcia-Verdugo 2005). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual la SP-A promueve la agregación de Re-LPS, el que se haya propuesto el dominio de unión a lípidos como posible sitio de unión del lípido A en la molécula de SP-A (Van Iwaarden *et al.* 1994) parece sugerir que el mecanismo de agregación de Re-LPS podría ser parecido al de agregación de vesículas lipídicas. Por ello, es posible que los cambios en la estructura de la proteína debidos a la unión del fármaco puedan estar relacionados con el aumento en la capacidad de SP-A de agregar tanto Re-LPS como DPPC/POPG en presencia de FK506.

La capacidad de la SP-A de autoasociarse y de unir y agregar fosfolípidos está estrechamente ligada con sus funciones relacionadas con el surfactante pulmonar. La red formada por los octadecámeros de SP-A interactuando con las membranas del surfactante de bicapas contiguas estabilizaría los agregados grandes del surfactante, disminuiría la inactivación del surfactante por proteínas del plasma y evitaría la adhesión de endotoxinas o bacterias al espacio alveolar (Casals and Garcia-Verdugo 2005). Respecto al papel que desempeña la SP-A en la función tensioactiva del surfactante pulmonar, se sabe que esta proteína favorece el transporte del surfactante hacia la interfase (Yu and Possmayer 1996) y su expansión en la interfase aire-líquido. Dado que *in vitro* induce la agregación de vesículas lipídicas, es posible que medie contactos entre bicapas así como entre monocapa y bicapa del surfactante pulmonar. La unión de tacrolimus a SP-A no modificó la capacidad de la proteína de promover la adsorción de las membranas de surfactante porcino que contienen SP-B y SP-C a la interfase aire-líquido, observándose un aumento adicional en la difusión de las vesículas lipídicas hacia la interfase debido al fármaco (Figura 11).

Otra de las funciones importantes de la SP-A es su actividad como agente bactericida y bacteriostático. Dado que la unión de tacrolimus a SP-A aumentó la capacidad de la

proteína de agregar el LPS rugoso se estudió si podría tener algún efecto sobre la capacidad de la SP-A de inhibir el crecimiento y aumentar la muerte bacteriana de cepas con fenotipo rugoso. Los resultados indican que la unión de ambas moléculas no afectó a la capacidad de la SP-A de inhibir el crecimiento bacteriano (Figura 12) y la muerte bacteriana (Figura 13). Parece que el efecto bactericida es independiente de la capacidad de SP-A de aglutinar estas cepas y que se trataría de un efecto directo de permeabilización de la pared bacteriana (Wu *et al.* 2003). No obstante, para que esta permeabilización se produzca parece ser necesaria una interacción entre la proteína y el LPS rugoso (Kuzmenko *et al.* 2006), por lo que pudiera ser que *in vivo* la presencia de tacrolimus en el fluido alveolar facilitara la unión de la SP-A al LPS bacteriano, lo que conllevaría una mayor permeabilización bacteriana. Los resultados también indican que el tacrolimus por sí solo carece de efecto bacteriostático o bactericida. A pesar de que el fármaco pertenece al grupo de los macrólidos, caracterizados por poseer un anillo macrocíclico de lactona, y que la gran mayoría de los macrólidos son antibióticos, el tacrolimus carece de efecto antibiótico, al menos a las concentraciones ensayadas.

Otra de las funciones de la SP-A es su capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T y la secreción de IL-2 *in vitro* (Borron *et al.* 1996). Esta actividad inmunosupresora depende del dominio de colágeno de la proteína (Borron *et al.* 1998). Los resultados demuestran la disminución de la secreción de IL-2 en células Jurkat estimuladas en presencia de SP-A (Figura 16), tacrolimus (Figura 14) o de ambas moléculas interactuando (Figuras 15, 16 y 17). El principal mecanismo de acción de tacrolimus consiste en la inhibición de la secreción de IL-2 en linfocitos T mediante una inhibición de la actividad de la calcineurina (Fruman *et al.* 1992) y en este modelo celular esta inhibición se produce a concentraciones tan bajas como 10^{-12} M (Figura 14). Los resultados demuestran que la incubación de fármaco y proteína resulta beneficiosa a la hora de disminuir la secreción de IL-2 en linfocitos T y que la interacción entre ambos en solución no supone una pérdida en las propiedades inmunosupresoras de ninguno de ellos (Figuras 15 y 16). Incluso parece que la interacción entre el tacrolimus y la SP-A potenciaría la capacidad inmunosupresora del fármaco. Dado que los estudios de dispersión de luz dinámica demuestran que la unión entre el tacrolimus y la SP-A produce la desagregación de las moléculas de tacrolimus en solución, este aumento en la capacidad inmunosupresora del fármaco podría deberse a una mayor facilidad de entrada de las moléculas en la célula. De esta forma, la capacidad inmunosupresora de

fármaco en el entorno alveolar, donde la SP-A se encuentra presente, podría verse incrementada.

Todos estos resultados nos llevan a concluir que la unión de tacrolimus y SP-A es de alta afinidad, como demuestran los estudios tanto en solución como en soporte sólido. La unión entre el tacrolimus y la SP-A no sólo no afecta negativamente a la capacidad inmunosupresora del fármaco, sino que incluso la potencia, presumiblemente por una desagregación del tacrolimus que facilitaría su entrada al interior de la célula. Por tanto, la presencia de la SP-A en el fluido alveolar no afectará a la función del fármaco administrado intratraquealmente. Además, la unión del tacrolimus a SP-A no afecta a las funciones de la proteína de promover la adsorción del surfactante, microbicidas e inmunomoduladoras, por lo que la instilación del tacrolimus no tendrá efectos perjudiciales sobre, al menos, la proteína mayoritaria presente en el fluido alveolar.

CAPÍTULO 4

Actividad antiinflamatoria de los complejos tacrolimus/ SP-A sobre macrófagos

1. RESUMEN

La administración intratraqueal de fármacos inmunosupresores es un tratamiento novedoso tras el trasplante de pulmón. La administración de nanopartículas de tacrolimus producidas a partir de una congelación ultrarrápida permite una llegada eficaz del fármaco al pulmón, donde podría interaccionar con la SP-A, la lipoproteína más abundante en el fluido alveolar. Los resultados del capítulo 3 demuestran que el tacrolimus se une a la SP-A con una K_d de 12 ± 2 nM y que la interacción de ambas moléculas no afecta a las propiedades inmunosupresoras de cada una de ellas por separado en linfocitos T. Este estudio se ha llevado a cabo para determinar si el tacrolimus y la SP-A humana interfieren con las acciones antiinflamatorias de cada uno de ellos por separado en macrófagos estimulados. Los resultados indican que el tacrolimus libre a concentraciones ≤ 0.1 μ M no tiene efecto en la respuesta inflamatoria de macrófagos estimulados con LPS. No obstante, la incubación de tacrolimus y SP-A a concentraciones a las que ninguno de los dos por separado tiene efecto antiinflamatorio inhibió significativamente la activación de NF- κ B y la secreción de TNF- α en macrófagos estimulados con LPS. El tacrolimus libre (0.01 nM – 10 μ M), pero no unido a SP-A, fue sustrato de la proteína de multirresistencia a drogas P-glicoproteína. El tacrolimus unido a la SP-A entró al interior celular por endocitosis, ya que varios inhibidores de la misma bloquearon el efecto antiinflamatorio del complejo tacrolimus-SP-A. Esta endocitosis pareció depender, al menos en parte, de la unión de SP-A a su receptor, SP-R210. Estos resultados indican que los complejos formados por tacrolimus y SP-A tienen un efecto antiinflamatorio mayor que el que poseen cada uno de ellos por separado y sugieren que la SP-A aumentaría la capacidad antiinflamatoria del fármaco facilitando la entrada de tacrolimus en la célula y evitando su expulsión por la P-glicoproteína.

2. INTRODUCCIÓN

El pulmón es un órgano favorable para la administración local de fármacos de forma intratraqueal. La administración por inhalación de tacrolimus podría suponer un avance significativo en el tratamiento de enfermedades respiratorias, ya que se lograría una inmunosupresión local adecuada reduciéndose buena parte de los efectos secundarios asociados a la administración sistémica del fármaco. Un estudio realizado con un modelo de trasplante de pulmón demostró que la administración de tacrolimus por inhalación mantuvo las propiedades inmunosupresoras del fármaco con respecto a la

administración intramuscular, con niveles sanguíneos indetectables 4 días después del trasplante (Ingu *et al.* 2005). Otro estudio realizado con un modelo de trasplante de tráquea en ratas demostró que la administración de tacrolimus inhalado en aerosoles disminuía los efectos secundarios respecto a la administración por vía oral al reducir hasta niveles prácticamente indetectables la presencia de fármaco en sangre tras la inhalación. Además, el tratamiento con tacrolimus inhalado resultó eficaz a la hora de reducir el rechazo, aunque su efecto fue menos duradero que el de la administración oral (Schrepfer *et al.* 2007). Recientemente se han desarrollado preparaciones de nanopartículas de tacrolimus para ser administradas por nebulización (Sinswat *et al.* 2008) (Watts *et al.* 2010). Estas nanopartículas están producidas por la tecnología de congelación ultrarrápida, que permite la obtención de agregados nanoestructurados formados por partículas de entre 100 y 200 nm que presentan una gran superficie de contacto, lo que se traduce en una velocidad de disolución del fármaco mucho mayor que facilita su nebulización. Los resultados *in vivo* en modelos de ratón demuestran una llegada del fármaco a los espacios alveolares y una alta absorción en el tejido pulmonar.

Mediante esta forma de administración el tacrolimus accede al espacio alveolar, donde podría interaccionar con la SP-A, proteína más abundante en el fluido alveolar. En el capítulo 3 hemos demostrado que el tacrolimus y la SP-A se unen con una K_d de 12 ± 2 nM y que la interacción de ambas moléculas potencia las propiedades inmunosupresoras de cada una de ellas por separado en linfocitos T.

Además de como inmunosupresor, el tacrolimus está siendo empleado como fármaco antiinflamatorio. De la misma forma, otra de las funciones inmunes de la SP-A consiste en modular la producción de mediadores inflamatorios y la fagocitosis de patógenos en macrófagos alveolares. Existen estudios que demuestran que la SP-A humana inhibe la secreción de TNF- α en macrófagos alveolares humanos (Arias-Díaz *et al.* 2000) o células U937 (Sanchez-Barbero *et al.* 2005) estimuladas con LPS. La capacidad antiinflamatoria de la SP-A no parece depender de su unión al LPS sino que más bien sería debida a la unión a receptores celulares o a moléculas accesorias presentes en el fluido alveolar, entre ellos CD14 (García-Verdugo *et al.* 2005), TL-4 y MD-2 (Yamada *et al.* 2006) o SIRP- α (Gardai *et al.* 2003). Además, la SP-A es capaz de unirse a otros receptores presentes en la membrana plasmática de los macrófagos alveolares, entre

ellos el SP-R210 a través del cual induce el aumento de la fagocitosis de *Mycobacterium bovis* (Weikert *et al.* 1997).

El objetivo de este estudio consiste en determinar si los complejos formados por el tacrolimus y la SP-A interfieren con las acciones antiinflamatorias de cada uno de ellos por separado en macrófagos estimulados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento de SP-A

La SP-A se aisló a partir de aspirados broncoalveolares de pacientes con proteinosis de forma similar a (Sanchez-Barbero *et al.* 2005) tal y como se detalla en el apartado 3.1 del capítulo 3 (página 138).

3.2. Condiciones de cultivo, diferenciación y estimulación de células U937

El modelo celular utilizado para estos estudios fue el de las células U937. Las condiciones de cultivo, diferenciación y estimulación fueron similares a las detalladas en los apartados 3.1., 3.2. y 3.4. del capítulo 1. Antes de la estimulación con LPS se añadieron al medio distintas concentraciones de SP-A, tacrolimus, o tacrolimus incubado con una concentración fija de SP-A. Para el ensayo con los inhibidores de endocitosis los pocillos se preincubaron durante 10 minutos con nocodazol, oligomicina, bafilomicina, monensina o EIPA antes de la adición del fármaco y/o la proteína. Para el ensayo con el anticuerpo, los pocillos se preincubaron durante 30 minutos con el anticuerpo anti-SP-R210 humano desarrollado en conejo antes de la adición del fármaco y/o la proteína.

3.3. Extracción nuclear

La extracción nuclear se realizó tal y como se detalla en el apartado 3.8 del capítulo 1 (página 74).

3.4. Cuantificación de TNF- α

La cuantificación de TNF- α se realizó mediante un ELISA a partir de los sobrenadantes celulares tal y como se detalla en el apartado 3.9 del capítulo 1 (página 75).

3.5. Ensayo de actividad de NF- κ B

La cuantificación de NF- κ B a partir de los extractos nucleares de las células se realizó mediante un ensayo que combina el principio del EMSA con el del ELISA, tal y como se detalla en el apartado 3.10 del capítulo 1 (página 75).

3.6. Ensayo de captura de calceína

Para determinar si el tacrolimus unido a la SP-A es sustrato de la proteína de multirresistencia a drogas P-glicoproteína se realizó un ensayo de captura de calceína tal y como se detalla en el apartado 3.11 del capítulo 1 (página 76).

3.7. Análisis estadísticos

Todos los datos representan la media \pm desviación estándar de medidas concretas. Las medias estaban normalmente distribuidas (test de Shapiro-Wilk). Los análisis se realizaron por el test t de Student. Se consideraron diferencias significativas a los valores de $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Actividad antiinflamatoria

Para determinar el efecto antiinflamatorio de la SP-A, el tacrolimus y el complejo tacrolimus/SP-A se midieron los niveles de TNF- α secretados al medio por células U937 diferenciadas con PMA durante 24 horas y estimuladas con LPS liso durante 4 horas en presencia de distintas concentraciones de SP-A, de tacrolimus libre o de varias concentraciones de tacrolimus incubado con una concentración fija de SP-A. La Figura 1 indica que la SP-A inhibió la secreción de TNF- α en macrófagos estimulados con LPS a partir de una concentración de 5 μ g/ml.

La Figura 2 muestra que mientras que el tacrolimus libre sólo produjo una inhibición de la secreción de TNF- α a partir de concentraciones de 10^{-5} M, la incubación de tacrolimus con SP-A a concentraciones a las que ninguno de ellos posee efecto antiinflamatorio (desde 10^{-9} M de fármaco y a una concentración de proteína de 2.5 μ g/ml) inhibió significativamente la secreción de TNF- α en macrófagos estimulados.

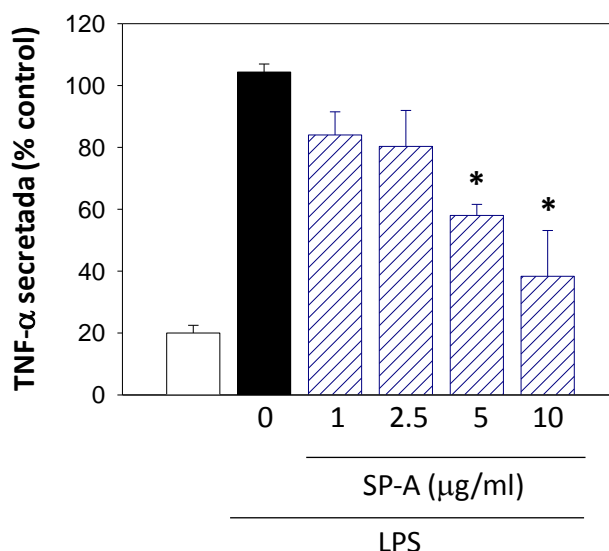


Figura 1: Efecto de distintas concentraciones de SP-A sobre la secreción de TNF- α en células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 4 horas con LPS (1 μ g/ml). Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células diferenciadas y estimuladas con LPS. * $p < 0.05$ vs control positivo.

Para dilucidar si este aumento del efecto antiinflamatorio del fármaco fue consecuencia de su unión específica con SP-A, se realizaron estudios utilizando otra proteína que se une al tacrolimus con una constante de disociación similar a la de la SP-A, la albúmina de suero humana (Canadas *et al.* 2005). La Figura 3 indica que mientras que la incubación de tacrolimus y SP-A, a concentraciones a las cuales ninguno de los dos componentes por separado mostró capacidad antiinflamatoria, inhibió significativamente la secreción de TNF- α en macrófagos estimulados, la presencia de albúmina en el medio no aumentó la capacidad antiinflamatoria del fármaco. Estos datos por tanto demuestran que el aumento del efecto antiinflamatorio del tacrolimus se debe a una unión específica con la SP-A.

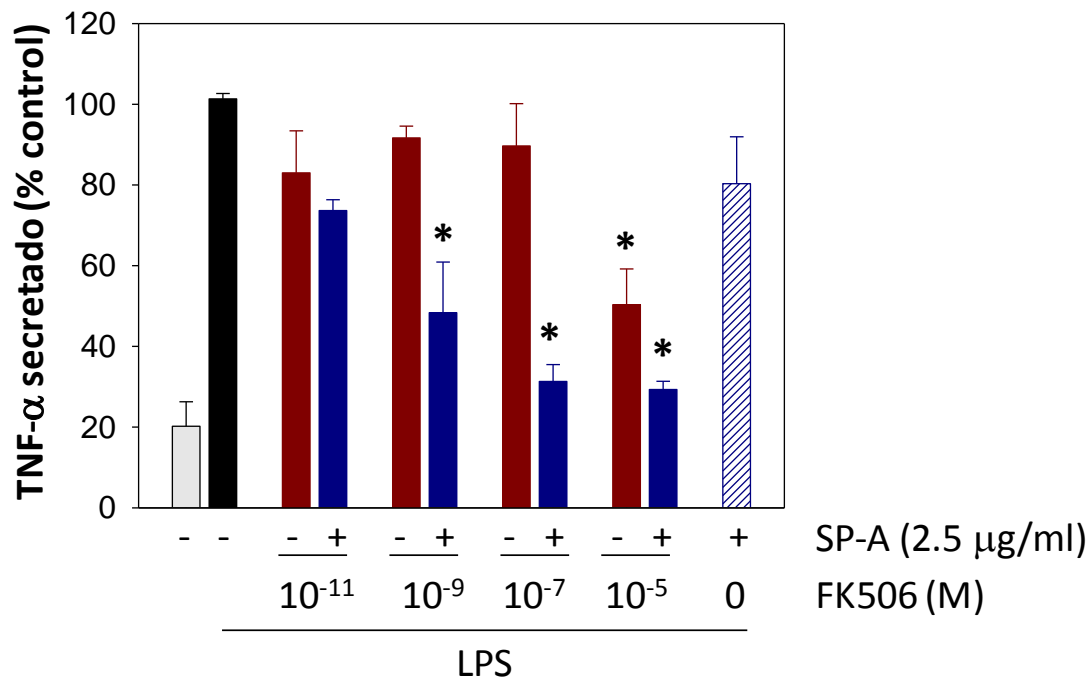


Figura 2: Efecto de distintas concentraciones de tacrolimus libre (barras rojas) o unido a SP-A a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (barras azules) sobre la secreción de TNF- α en células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 4 horas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). La barra rayada representa el efecto de la SP-A a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células diferenciadas y estimuladas con LPS. * $p < 0.05$ vs control positivo.

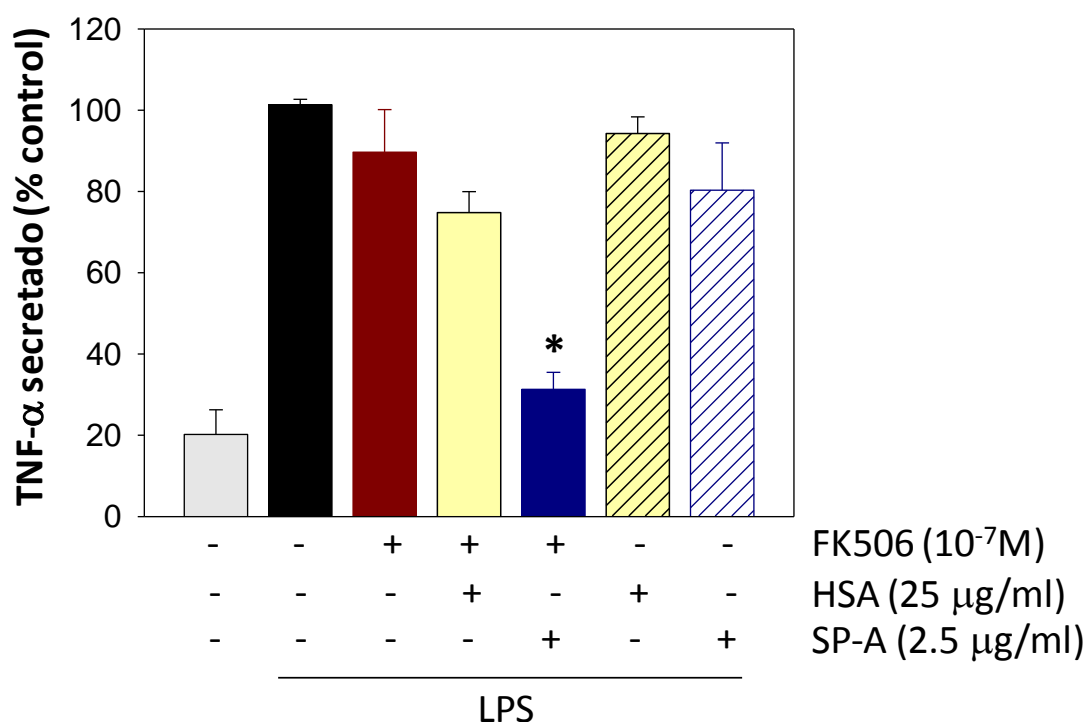


Figura 3: Efecto de una concentración de $10^{-7}M$ de tacrolimus libre (barra roja), unido a albúmina de suero humana (HSA) a una concentración de 25 $\mu g/ml$ (barra amarilla) o a SP-A a una concentración de 2.5 $\mu g/ml$ (barra azul) sobre la secreción de TNF- α en células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 4 horas con LPS (1 $\mu g/ml$). Las barras rayadas representan el efecto de la HSA (25 $\mu g/ml$) o la SP-A (2.5 $\mu g/ml$). Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células diferenciadas y estimuladas con LPS. * $p < 0.05$ vs control positivo.

Para determinar si la secreción de TNF- α ocurre como consecuencia de la activación del factor de transcripción NF- κB se estudió el efecto del tacrolimus libre o unido a la SP-A sobre la presencia de la subunidad p50 de NF- κB en el extracto nuclear de células U937 diferenciadas a macrófagos y estimuladas con LPS durante 1 hora. La Figura 4 indica que, al igual que ocurría en el caso de la secreción de TNF- α , la incubación de tacrolimus con SP-A a concentraciones a las cuales ninguno de los dos componentes por separado mostró capacidad antiinflamatoria, disminuyó la presencia de la subunidad p50 de NF- κB en macrófagos estimulados por LPS.

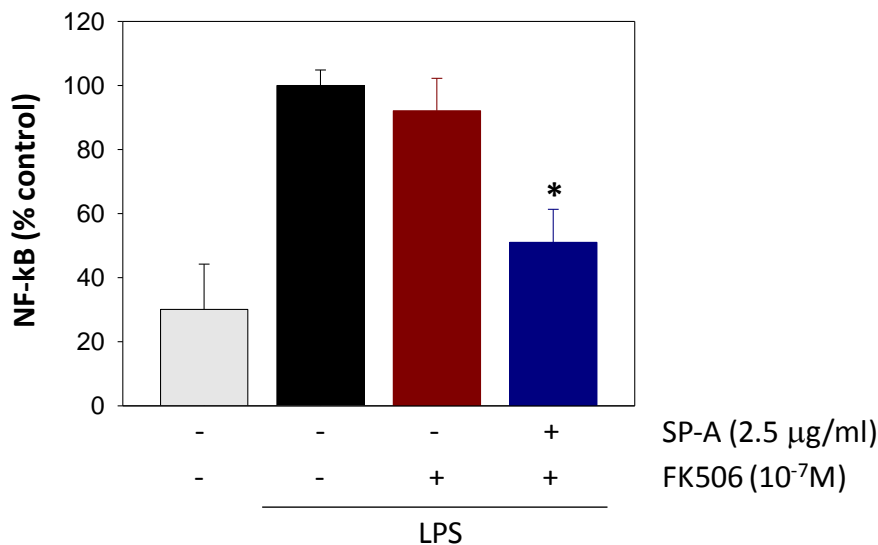


Figura 4: Efecto de una concentración de 10^{-7} M de tacrolimus libre o unido a SP-A a una concentración de 2.5 μ g/ml sobre la presencia de la subunidad p50 de NF- κ B en el extracto nuclear de células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 1 hora con LPS (1 μ g/ml). Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células diferenciadas y estimuladas con LPS. * $p < 0.05$ vs control positivo.

4.2. Entrada de tacrolimus libre o unido a SP-A en la célula

Para estudiar si el tacrolimus unido a la SP-A es sustrato de la P-glicoproteína se realizó un ensayo de captura de calceína utilizando distintas concentraciones de tacrolimus libre o unido a SP-A a una concentración de 2.5 μ g/ml. La Figura 6 muestra que el porcentaje de calceína capturada en el citoplasma no aumentó con concentraciones crecientes de tacrolimus cuando éste se encontraba unido a la SP-A, lo que demuestra que cuando el fármaco está unido a la proteína no es sustrato de la P-glicoproteína. Estos resultados explican las diferencias encontradas en cuanto a la capacidad antiinflamatoria del fármaco cuando se encuentra libre o unido a la SP-A, ya que aunque la concentración de tacrolimus depositada en el medio es la misma en ambos casos, la cantidad real que entra en la célula y que por tanto puede unirse a la FKBP y ejercer su efecto intracelular es varios órdenes de magnitud mayor cuando se encuentra unido a la SP-A.

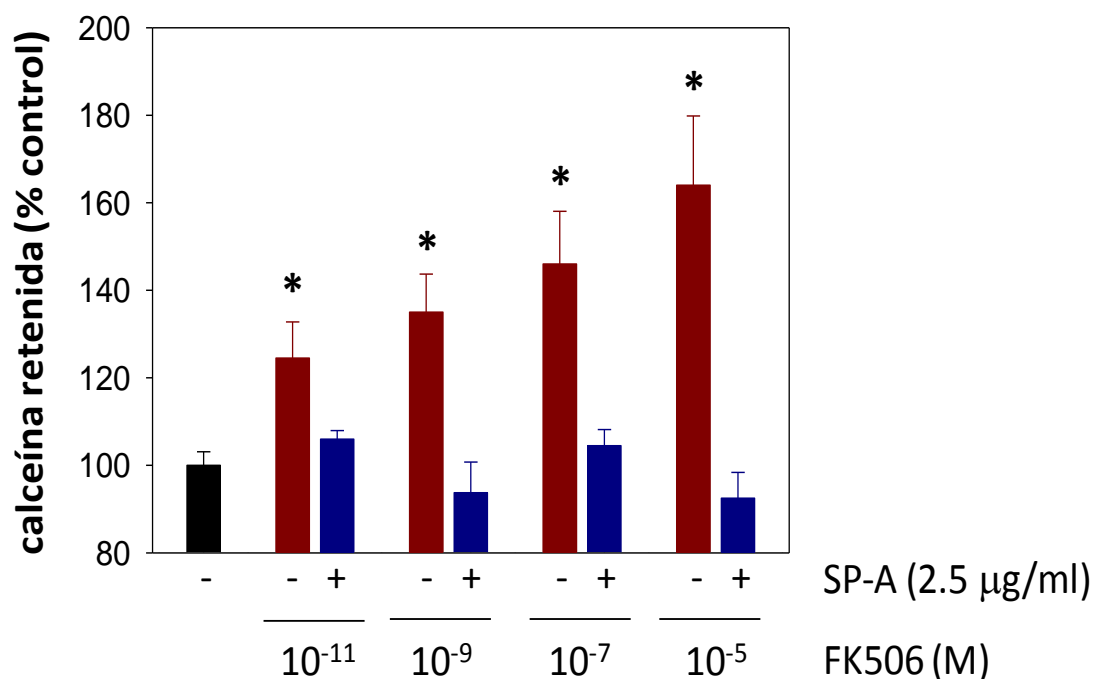


Figura 5: Efecto de distintas concentraciones de tacrolimus libre (barras rojas) o unido a SP-A a una concentración de 2.5 µg/ml (barras azules) sobre la captura de calceína. Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control correspondiente a la calceína capturada en ausencia de tacrolimus libre o unido a SP-A (barra negra). * $p < 0.05$ vs control.

Para determinar el mecanismo de entrada del tacrolimus unido a la SP-A en la célula se determinaron los niveles de TNF- α secretados al medio en presencia de distintos inhibidores de endocitosis y de una concentración del complejo tacrolimus SP-A con alto efecto antiinflamatorio (10^{-7} M de fármaco y 2.5 µg/ml de proteína). La Figura 6 muestra que el efecto antiinflamatorio de tacrolimus liposomal fue parcialmente revertido por la presencia en el medio de distintos inhibidores de endocitosis, lo que sugiere que el fármaco administrado de forma liposomal está siendo internalizado vía endocitosis.

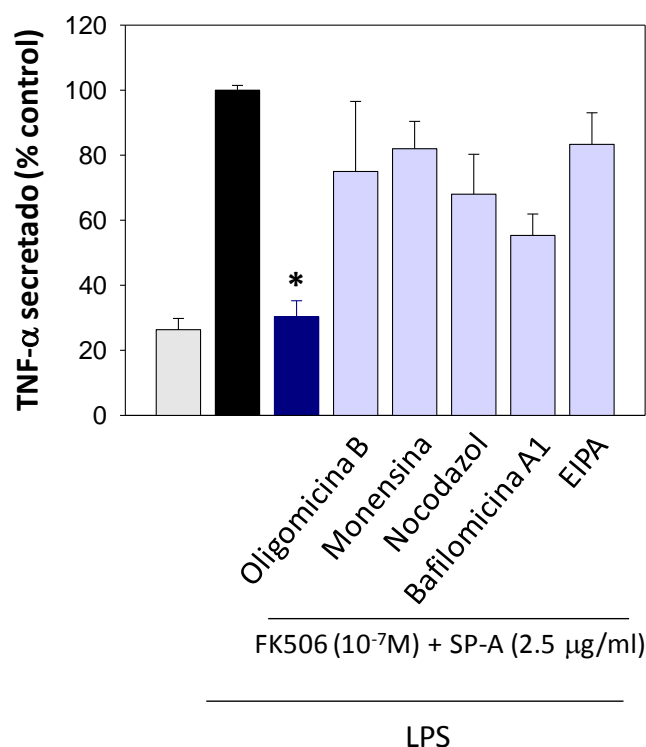


Figura 6: Efecto de una concentración de 10^{-7} M de tacrolimus unido a SP-A a una concentración de 2.5 µg/ml sobre la secreción de TNF- α en células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 4 horas con LPS (1 µg/ml) en presencia de distintos inhibidores de endocitosis: oligomicina B (10 µg/ml), monensina (25 µM), nocodazol (10 µM), bafilomicina A1 (0.2 µM) y EIPA (100 µM). Los resultados (media \pm desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células diferenciadas y estimuladas con LPS. * $p < 0.05$ vs control positivo.

Para investigar si la endocitosis estuvo mediada por la unión de la SP-A a uno de sus receptores, el SP-R210, presente en la membrana plasmática de las células U937 (Chroneos *et al.* 1996), se determinaron los niveles de TNF- α secretados al medio en presencia de un anticuerpo anti-SP-R210 y de una concentración del complejo tacrolimus SP-A con alto efecto antiinflamatorio (10^{-7} M de fármaco y 2.5 µg/ml de proteína). La Figura 7 muestra que el efecto inhibitorio del tacrolimus unido a la SP-A fue parcialmente bloqueado en presencia del anticuerpo anti-SP-R210.

Todos estos resultados nos permiten concluir que la SP-A incrementa la actividad antiinflamatoria del fármaco facilitando su entrada al interior de la célula por

endocitosis y evitando de esta forma su expulsión por la P-glicoproteína. Esta endocitosis parece estar mediada por la unión de la SP-A a su receptor, SP-R210.

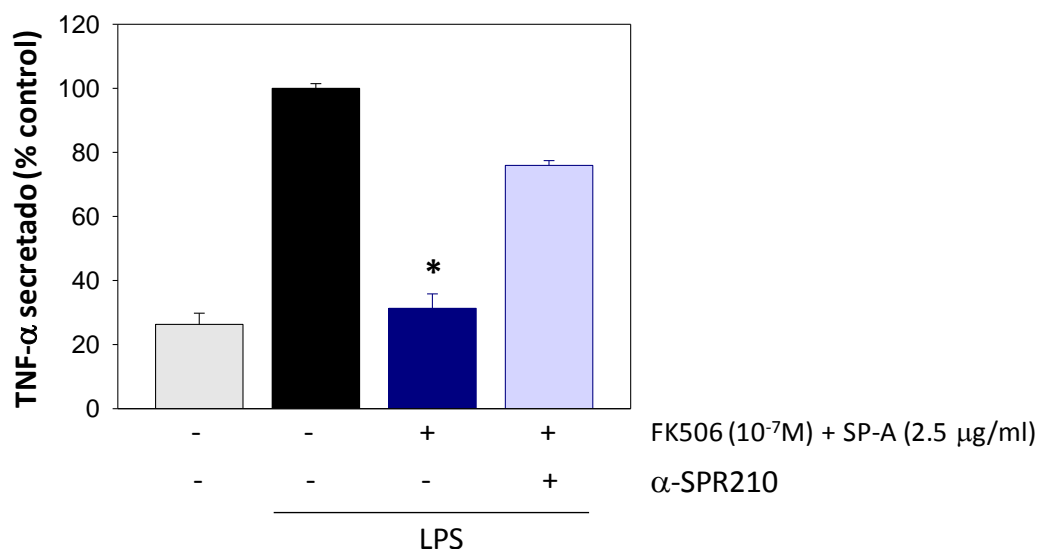


Figura 7: Efecto de una concentración de 10⁻⁷M de tacrolimus unido a SP-A a una concentración de 2.5 µg/ml sobre la secreción de TNF-α en células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA (10 nM) y estimuladas durante 4 horas con LPS (1 µg/ml) en presencia de un anticuerpo anti-SP-R210 humano desarrollado en conejo (25 µg/ml). Los resultados (media ± desviación estándar de 4 experimentos distintos hechos cada uno de ellos por triplicado) están expresados como porcentaje respecto al control positivo (barra negra) correspondiente a las células diferenciadas y estimuladas con LPS. * p<0.05 vs control positivo.

5. DISCUSIÓN

En el capítulo 3 demostramos que el tacrolimus se unía a la SP-A con una K_d de 12 ± 2 nM y que la interacción de ambas moléculas potenciaba las propiedades inmunosupresoras de cada una de ellas por separado en linfocitos T. En este capítulo se ha abordado el estudio de la capacidad antiinflamatoria de complejos formados por tacrolimus y SP-A sobre macrófagos activados por LPS. Los resultados indican que mientras que concentraciones de 10⁻⁵ M de tacrolimus libre y de 5 µg/ml de SP-A fueron necesarias para lograr una inhibición parcial de la secreción de TNF-α en macrófagos estimulados con LPS, la incubación desde una concentración de 10⁻⁹ M de tacrolimus con una de 2.5 µg/ml de SP-A inhibió significativamente esta secreción. Estos datos por tanto demuestran que los complejos formados por tacrolimus y SP-A tienen un efecto antiinflamatorio mayor que el que poseen cada uno de ellos por separado. Dado que la incubación de tacrolimus con la albúmina, proteína a la que el

fármaco también se une (Canadas *et al.* 2005), no supuso un aumento en la capacidad antiinflamatoria del fármaco, la inhibición en la secreción de TNF- α en macrófagos estimulados por LPS se debe a su unión específica con la SP-A.

Los ensayos de captura de calceína demuestran que el tacrolimus unido a la SP-A, al contrario que la forma libre, no es sustrato de la P-glicoproteína. El complejo formado por ambas moléculas permite que se alcance una mayor concentración de tacrolimus intracelular al no ser expulsado el fármaco al exterior por la P-glicoproteína. Los experimentos de secreción de TNF- α por macrófagos estimulados por LPS en presencia de distintos inhibidores de endocitosis demostraron que la anulación del proceso de endocitosis disminuye el efecto antiinflamatorio del complejo tacrolimus/SP-A, lo que sugiere que estos complejos están entrando al interior celular vía endocitosis. La SP-A es degradada por los macrófagos alveolares (Wright and Youmans 1995). Esta degradación parece realizarse por un mecanismo endocítico dependiente de clatrina (Baritussio *et al.* 2000). Un estudio sugiere que esta endocitosis dependiente de clatrina está mediada por la unión de la SP-A a un receptor y que aunque es dependiente de calcio no se produce a través del dominio de reconocimiento de carbohidratos (Crowther and Schlesinger 2006). La SP-A tiene receptores específicos en los macrófagos necesarios para ejercer sus funciones sobre estas células y que podrían estar implicados en el mecanismo de captura y endocitosis de la proteína. Uno de los posibles candidatos es el receptor SP-R210, presente en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares, entre ellos las células U937, los macrófagos alveolares o los neumocitos tipo II (Chroneos *et al.* 1996). El hecho de que macrófagos y neumocitos tipo II compartan este receptor hace pensar que podría estar implicado en mecanismos de reciclaje y degradación de SP-A y, dado que se ha comprobado que este receptor puede asociarse con el citoesqueleto de actina (Chroneos *et al.* 1996), que esté relacionado con la ruta endocítica. Este receptor ha sido identificado como una forma corta de la proteína MyO XVIII A, localizada tanto en la membrana plasmática como en la de otros compartimentos subcelulares (Yang *et al.* 2005) y la SP-A se une a él no a través del dominio de reconocimiento de carbohidratos sino del segmento de colágeno (Borron *et al.* 1998). Nuestros resultados demuestran que la incubación con un anticuerpo anti-SP-R210 bloquea parcialmente el efecto inhibitorio de los complejos tacrolimus/SP-A, por lo que parece que la entrada del complejo se estaría produciendo por una endocitosis dependiente de la unión de la SP-A a su receptor SP-R210.

Recientemente se ha descubierto que uno de los efectos antiinflamatorios que tiene la SP-A en macrófagos, estabilizando I κ B a través (Wu *et al.* 2004) de la PKC atípica ζ (Moulakakis *et al.* 2007), podría estar realizado a través de un mecanismo de señalización intracelular, ya que la SP-A ha de ser internalizada por la vía endocítica asociada a moléculas de clatrina para estabilizar a I κ B- α , y por tanto inhibir la activación de NF- κ B y la secreción de TNF- α inducida por LPS (Moulakakis and Stamme 2009).

En resumen, los resultados indican que los complejos formados por tacrolimus y SP-A tienen un efecto antiinflamatorio marcadamente mayor que el que poseen cada uno de ellos por separado sobre macrófagos estimulados con LPS y sugieren que la SP-A incrementa la capacidad antiinflamatoria del fármaco facilitando su entrada al interior de la célula vía endocitosis dependiente del receptor SP-R210 y evitando su expulsión por la P-glicoproteína. De esta forma, la presencia de la SP-A en el fluido alveolar potenciaría el efecto antiinflamatorio del tacrolimus sobre macrófagos alveolares al ser administrado intratraquealmente. Por otra parte, los niveles de SP-A disminuyen en patologías pulmonares tales como el ARDS (Baker *et al.* 1999) o el daño por isquemia reperusión (Veldhuizen *et al.* 1993) (Casals *et al.* 1998) (Valino *et al.* 2004). Hay estudios que demuestran que la SP-A se encuentra disminuida tras un trasplante de pulmón y que la administración de un surfactante enriquecido en SP-A mejora significativamente la eficacia del tratamiento (Erasmus *et al.* 2002). Por tanto, el uso combinado de SP-A y tacrolimus podría resultar doblemente beneficioso para el tratamiento de estas enfermedades. Por un lado aumentaría la capacidad antiinflamatoria del fármaco, lo que posibilitaría una reducción de la dosis lográndose de esta forma una menor toxicidad y por otro minimizaría los daños asociados a la disminución de la proteína y, por tanto, a la pérdida de sus funciones.

CONCLUSIONES

Respecto a la investigación sobre la capacidad antiinflamatoria del tacrolimus liposomal y los efectos beneficiosos de esta formulación, in vivo, en un modelo de trasplante de pulmón concluimos que:

- El tacrolimus liposomal presenta una actividad antiinflamatoria varios órdenes de magnitud mayor que el tacrolimus libre sobre macrófagos estimulados con LPS. La encapsulación del fármaco en nanoliposomas facilita la entrada del tacrolimus al interior de la célula por endocitosis, lo que evita la expulsión del fármaco por la P-glicoproteína.
- La administración intratraqueal de tacrolimus liposomal en el donante disminuye la inflamación causada por el daño por isquemia reperusión tras el trasplante de pulmón. Esto se traduce en una mejora de la composición y funcionalidad del surfactante pulmonar de los pulmones transplantados y en la normalización de la oxigenación arterial del animal receptor. Los nanoliposomas utilizados para la vehiculización del tacrolimus facilitan la llegada del fármaco a los espacios alveolares y contribuyen a disminuir la inflamación.

Respecto a los estudios sobre la potencial interacción de tacrolimus libre con la proteína mayoritaria del fluido alveolar y sus consecuencias sobre las propiedades inmunomoduladoras del fármaco y sobre las funciones de la proteína concluimos que:

- El tacrolimus se une a la proteína mayoritaria del fluido alveolar, SP-A, con una constante de disociación de 12 ± 2 nM. Esta interacción produce cambios conformacionales en la proteína que se traducen en un aumento en la capacidad de la SP-A de unión a ligandos. La unión entre el tacrolimus y la SP-A potencia la capacidad inmunosupresora del fármaco en linfocitos T, presumiblemente por una desagregación de las partículas de tacrolimus que facilitaría su entrada al interior de la célula. Además, la unión de tacrolimus a la SP-A no afecta a las funciones microbidas e inmunomoduladoras de la proteína y a la capacidad de la SP-A de potenciar la actividad biofísica del surfactante.
- Los complejos tacrolimus-SP-A tienen una actividad antiinflamatoria mucho mayor que la que presentan cada uno de ellos por separado en macrófagos estimulados por LPS. La SP-A incrementa la capacidad antiinflamatoria del tacrolimus facilitando su entrada al interior de la célula por endocitosis dependiente del receptor SP-R210.

BIBLIOGRAFÍA

- Akashi, A., K. Nakahara, W. Kamiike, A. Matsumura, N. Hatanaka, Y. Kawashima, Y. Yoshida and K. Tagawa (1993) Attenuation of warm ischemic injury of rat lung by inflation with room air--assessment of cellular components and the surfactant in the bronchoalveolar lavage fluid in relation to changes in cellular adenosine triphosphate. *Transplantation*. **55**, 24-30.
- Alemdar, A. Y., D. Sadi, V. C. McAlister and I. Mendez (2004) Liposomal formulations of tacrolimus and rapamycin increase graft survival and fiber outgrowth of dopaminergic grafts. *Cell Transplant*. **13**, 263-71.
- Alig, T. F., H. E. Warriner, L. Lee and J. A. Zasadzinski (2004) Electrostatic barrier to recovery of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers after collapse. *Biophys J*. **86**, 897-904.
- Aller, S. G., J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P. M. Harrell, Y. T. Trinh, Q. Zhang, I. L. Urbatsch and G. Chang (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*. **323**, 1718-22.
- Ambudkar, S. V., S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan and M. M. Gottesman (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **39**, 361-98.
- Ambudkar, S. V., C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna and M. M. Gottesman (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. **22**, 7468-85.
- Andersson, M., H. Gunne, B. Agerberth, A. Boman, T. Bergman, R. Sillard, H. Jornvall, V. Mutt, B. Olsson, H. Wigzell and et al. (1995) NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J*. **14**, 1615-25.
- Andreeva, A. V., M. A. Kutuzov and T. A. Voyno-Yasenetskaya (2007) Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **293**, L259-71.
- Arias-Diaz, J., I. Garcia-Verdugo, C. Casals, N. Sanchez-Rico, E. Vara and J. L. Balibrea (2000) Effect of surfactant protein A (SP-A) on the production of cytokines by human pulmonary macrophages. *Shock*. **14**, 300-6.
- Arias-Diaz, J., J. A. Idefonso, J. J. Munoz, A. Zapata and E. Jimenez (2009) Both tacrolimus and sirolimus decrease Th1/Th2 ratio, and increase regulatory T lymphocytes in the liver after ischemia/reperfusion. *Lab Invest*. **89**, 433-45.
- Baatz, J. E., B. Elledge and J. A. Whitsett (1990) Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers. *Biochemistry*. **29**, 6714-20.
- Baker, C. S., T. W. Evans, B. J. Randle and P. L. Haslam (1999) Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome. *Lancet*. **353**, 1232-7.
- Baritussio, A., A. Alberti, D. Armanini, F. Meloni and D. Bruttomesso (2000) Different pathways of degradation of SP-A and saturated phosphatidylcholine by alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **279**, L91-9.
- Barnes, P. J. (2004) Ceramide lances the lungs. *Nat Med*. **10**, 130-1.
- Batenburg, J. J. and H. P. Haagsman (1998) The lipids of pulmonary surfactant: dynamics and interactions with proteins. *Prog Lipid Res*. **37**, 235-76.
- Baumgart, D. C., J. K. Macdonald and B. Feagan (2008) Tacrolimus (FK506) for induction of remission in refractory ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007216.
- Beck, D. C., C. L. Na, J. A. Whitsett and T. E. Weaver (2000) Ablation of a critical surfactant protein B intramolecular disulfide bond in transgenic mice. *J Biol Chem*. **275**, 3371-6.

- Beers, M. F. (1996) Inhibition of cellular processing of surfactant protein C by drugs affecting intracellular pH gradients. *J Biol Chem.* **271**, 14361-70.
- Benne, C. A., B. Benaissa-Trouw, J. A. van Strijp, C. A. Kraaijeveld and J. F. van Iwaarden (1997) Surfactant protein A, but not surfactant protein D, is an opsonin for influenza A virus phagocytosis by rat alveolar macrophages. *Eur J Immunol.* **27**, 886-90.
- Berg, T., R. Leth-Larsen, U. Holmskov and P. Hojrup (2000) Structural characterisation of human proteinosis surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta.* **1543**, 159-73.
- Bernard, G. R., A. Artigas, K. L. Brigham, J. Carlet, K. Falke, L. Hudson, M. Lamy, J. R. Legall, A. Morris and R. Spragg (1994) The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* **149**, 818-24.
- Bernardino de la Serna, J., J. Perez-Gil, A. C. Simonsen and L. A. Bagatolli (2004) Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *J Biol Chem.* **279**, 40715-22.
- Bernhard, W., S. Hoffmann, H. Dombrowsky, G. A. Rau, A. Kamlage, M. Kappler, J. J. Haitsma, J. Freihorst, H. von der Hardt and C. F. Poets (2001) Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant: composition in relation to respiratory rate and lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **25**, 725-31.
- Bierer, B. E., P. S. Mattila, R. F. Standaert, L. A. Herzenberg, S. J. Burakoff, G. Crabtree and S. L. Schreiber (1990) Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 9231-5.
- Bittner, H. B., S. W. Kendall, E. P. Chen, D. Craig and P. Van Trigt (1995) The effects of brain death on cardiopulmonary hemodynamics and pulmonary blood flow characteristics. *Chest.* **108**, 1358-63.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* **37**, 911-7.
- Borron, P., F. X. McCormack, B. M. Elhalwagi, Z. C. Chroneos, J. F. Lewis, S. Zhu, J. R. Wright, V. L. Shepherd, F. Possmayer, K. Inchley and L. J. Fraher (1998) Surfactant protein A inhibits T cell proliferation via its collagen-like tail and a 210-kDa receptor. *Am J Physiol.* **275**, L679-86.
- Borron, P., R. A. Veldhuizen, J. F. Lewis, F. Possmayer, A. Caveney, K. Inchley, R. G. McFadden and L. J. Fraher (1996) Surfactant associated protein-A inhibits human lymphocyte proliferation and IL-2 production. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **15**, 115-21.
- Bosshart, H. and M. Heinzelmann (2007) Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann N Y Acad Sci.* **1096**, 1-17.
- Brillantes, A. B., K. Ondrias, A. Scott, E. Kobrinsky, E. Ondriasova, M. C. Moschella, T. Jayaraman, M. Landers, B. E. Ehrlich and A. R. Marks (1994) Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell.* **77**, 513-23.
- Brockman, J. M., Z. Wang, R. H. Notter and R. A. Dluhy (2003) Effect of hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C on binary phospholipid monolayers: II. Infrared external reflectance-absorption spectroscopy. *Biophys J.* **84**, 326-40.
- Brown-Augsburger, P., D. Chang, K. Rust and E. C. Crouch (1996) Biosynthesis of surfactant protein D. Contributions of conserved NH2-terminal cysteine residues

- and collagen helix formation to assembly and secretion. *J Biol Chem.* **271**, 18912-9.
- Bultynck, G., H. De Smedt, J. B. Parys, G. Callewaert and L. Missiaen (2002) Washing out of lipophilic compounds induces a transient increase in the passive Ca(2+) leak in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium.* **31**, 229-33.
- Cameron, A. M., J. P. Steiner, A. J. Roskams, S. M. Ali, G. V. Ronnett and S. H. Snyder (1995) Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux. *Cell.* **83**, 463-72.
- Canadas, O., R. Guerrero, R. Garcia-Canero, G. Orellana, M. Menendez and C. Casals (2004) Characterization of liposomal tacrolimus in lung surfactant-like phospholipids and evaluation of its immunosuppressive activity. *Biochemistry.* **43**, 9926-38.
- Canadas, O., A. Saenz, G. Orellana and C. Casals (2005) Equilibrium studies of a fluorescent tacrolimus binding to surfactant protein A. *Anal Biochem.* **340**, 57-65.
- Carroll, J. L., Jr., D. M. McCoy, S. E. McGowan, R. G. Salome, A. J. Ryan and R. K. Mallampalli (2002) Pulmonary-specific expression of tumor necrosis factor- α alters surfactant lipid metabolism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **282**, L735-42.
- Casals, C. and I. Garcia-Verdugo (2005) Molecular and functional properties of Surfactant Protein A. *Lung surfactant function and disorder*. Nag, K. (ed.), Taylor and Francis Group, Boca Ratón, Florida
- Casals, C., L. Herrera, E. Miguel, P. Garcia-Barreno and A. M. Municio (1989) Comparison between intra- and extracellular surfactant in respiratory distress induced by oleic acid. *Biochim Biophys Acta.* **1003**, 201-3.
- Casals, C., H. Johansson, A. Saenz, M. Gustafsson, C. Alfonso, K. Nordling and J. Johansson (2008) C-terminal, endoplasmic reticulum-lumenal domain of prosurfactant protein C - structural features and membrane interactions. *FEBS J.* **275**, 536-47.
- Casals, C., E. Miguel and J. Perez-Gil (1993) Tryptophan fluorescence study on the interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid vesicles. *Biochem J.* **296** (Pt 3), 585-93.
- Casals, C., A. Varela, M. L. Ruano, F. Valino, J. Perez-Gil, N. Torre, E. Jorge, F. Tendillo and J. L. Castillo-Olivares (1998) Increase of C-reactive protein and decrease of surfactant protein A in surfactant after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* **157**, 43-9.
- Clipstone, N. A. and G. R. Crabtree (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* **357**, 695-7.
- Cockshutt, A. M., J. Weitz and F. Possmayer (1990) Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry.* **29**, 8424-9.
- Comalada, M., A. F. Valledor, E. Sanchez-Tillo, I. Umbert, J. Xaus and A. Celada (2003) Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases. *Eur J Immunol.* **33**, 3091-100.
- Combates, N. J., P. O. Kwon, R. W. Rzepka and D. Cohen (1997) Involvement of the transcription factor NF-IL6 in phorbol ester induction of P-glycoprotein in U937 cells. *Cell Growth Differ.* **8**, 213-9.

- Crapo, J. D., B. E. Barry, P. Gehr, M. Bachofen and E. R. Weibel (1982) Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis.* **126**, 332-7.
- Creuwels, L. A., E. H. Boer, R. A. Demel, L. M. van Golde and H. P. Haagsman (1995) Neutralization of the positive charges of surfactant protein C. Effects on structure and function. *J Biol Chem.* **270**, 16225-9.
- Crouch, E., K. Hartshorn and I. Ofek (2000) Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol Rev.* **173**, 52-65.
- Crouch, E., K. Rust, A. Persson, W. Mariencheck, M. Moxley and W. Longmore (1991) Primary translation products of pulmonary surfactant protein D. *Am J Physiol.* **260**, L247-53.
- Crouch, E. C. (1998) Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D). *Biochim Biophys Acta.* **1408**, 278-89.
- Crouch, E. C. (2000) Surfactant protein-D and pulmonary host defense. *Respir Res.* **1**, 93-108.
- Crowther, J. E. and L. S. Schlesinger (2006) Endocytic pathway for surfactant protein A in human macrophages: binding, clathrin-mediated uptake, and trafficking through the endolysosomal pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **290**, L334-42.
- Cruz, A., C. Casals and J. Perez-Gil (1995) Conformational flexibility of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C, studied in aqueous organic solvents. *Biochim Biophys Acta.* **1255**, 68-76.
- Chiang, C. H., K. Wu, C. P. Yu, H. C. Yan, W. C. Perng and C. P. Wu (1999) Hypothermia and prostaglandin E(1) produce synergistic attenuation of ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* **160**, 1319-23.
- Chougule, M., B. Padhi and A. Misra (2007) Nano-liposomal dry powder inhaler of tacrolimus: preparation, characterization, and pulmonary pharmacokinetics. *Int J Nanomedicine.* **2**, 675-88.
- Chow, D. K. and R. W. Leong (2007) The use of tacrolimus in the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Drug Saf.* **6**, 479-85.
- Christians, U., W. Jacobsen, L. Z. Benet and A. Lampen (2002) Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* **41**, 813-51.
- Christie, J. D., M. Carby, R. Bag, P. Corris, M. Hertz and D. Weill (2005a) Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II: definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* **24**, 1454-9.
- Christie, J. D., J. S. Sager, S. E. Kimmel, V. N. Ahya, C. Gaughan, N. P. Blumenthal and R. M. Kotloff (2005b) Impact of primary graft failure on outcomes following lung transplantation. *Chest.* **127**, 161-5.
- Chronos, Z. C., R. Abdolrasulnia, J. A. Whitsett, W. R. Rice and V. L. Shepherd (1996) Purification of a cell-surface receptor for surfactant protein A. *J Biol Chem.* **271**, 16375-83.
- Daud, S. A., R. D. Yusen, B. F. Meyers, M. M. Chakinala, M. J. Walter, A. A. Aloush, G. A. Patterson, E. P. Trulock and R. R. Hachem (2007) Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* **175**, 507-13.

- Dawson, T. M., J. P. Steiner, W. E. Lyons, M. Fotuhi, M. Blue and S. H. Snyder (1994) The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: relationship to calcineurin. *Neuroscience*. **62**, 569-80.
- de Jonge, H. and D. R. Kuypers (2008) Pharmacogenetics in solid organ transplantation: current status and future directions. *Transplant Rev (Orlando)*. **22**, 6-20.
- de Perrot, M., M. Liu, T. K. Waddell and S. Keshavjee (2003a) Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. **167**, 490-511.
- de Perrot, M., K. Young, Y. Imai, M. Liu, T. K. Waddell, S. Fischer, L. Zhang and S. Keshavjee (2003b) Recipient T cells mediate reperfusion injury after lung transplantation in the rat. *J Immunol*. **171**, 4995-5002.
- deMello, D. E., S. Heyman, D. S. Phelps and J. Floros (1993) Immunogold localization of SP-A in lungs of infants dying from respiratory distress syndrome. *Am J Pathol*. **142**, 1631-40.
- deMello, D. E., S. Heyman, D. S. Phelps, A. Hamvas, L. Nogee, S. Cole and H. R. Colten (1994) Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **11**, 230-9.
- Diemel, R. V., M. M. Snel, A. J. Waring, F. J. Walther, L. M. van Golde, G. Putz, H. P. Haagsman and J. J. Batenburg (2002) Multilayer formation upon compression of surfactant monolayers depends on protein concentration as well as lipid composition. An atomic force microscopy study. *J Biol Chem*. **277**, 21179-88.
- Dietl, P. and T. Haller (2005) Exocytosis of lung surfactant: from the secretory vesicle to the air-liquid interface. *Annu Rev Physiol*. **67**, 595-621.
- Dobbs, L. G., J. R. Wright, S. Hawgood, R. Gonzalez, K. Venstrom and J. Nellenbogen (1987) Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 1010-4.
- Dong, Q. and J. R. Wright (1996) Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. *J Immunol*. **156**, 4815-20.
- Dreyer, N., C. Muhlfeld, A. Fehrenbach, T. Pech, S. von Berg, R. Nagib, J. Richter, T. Wittwer, T. Wahlers and M. Ochs (2008) Exogenous surfactant application in a rat lung ischemia reperfusion injury model: effects on edema formation and alveolar type II cells. *Respir Res*. **9**, 5.
- Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem*. **263**, 9557-60.
- Efrati, H., S. Hawgood, M. C. Williams, K. Hong and B. J. Benson (1987) Divalent cation and hydrogen ion effects on the structure and surface activity of pulmonary surfactant. *Biochemistry*. **26**, 7986-93.
- El-Batawy, M. M., M. A. Bosseila, H. M. Mashaly and V. S. Hafez (2009) Topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *J Dermatol Sci*. **54**, 76-87.
- Elhalwagi, B. M., M. Zhang, M. Ikegami, H. S. Iwamoto, R. E. Morris, M. L. Miller, K. Dienger and F. X. McCormack (1999) Normal surfactant pool sizes and inhibition-resistant surfactant from mice that overexpress surfactant protein A. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **21**, 380-7.
- Emmel, E. A., C. L. Verweij, D. B. Durand, K. M. Higgins, E. Lacy and G. R. Crabtree (1989) Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science*. **246**, 1617-20.
- Emrie, P. A., C. Jones, T. Hofmann and J. H. Fisher (1988) The coding sequence for the human 18,000-dalton hydrophobic pulmonary surfactant protein is located on

- chromosome 2 and identifies a restriction fragment length polymorphism. *Somat Cell Mol Genet.* **14**, 105-10.
- Eppinger, M. J., G. M. Deeb, S. F. Bolling and P. A. Ward (1997) Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol.* **150**, 1773-84.
- Eppinger, M. J., M. L. Jones, G. M. Deeb, S. F. Bolling and P. A. Ward (1995) Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res.* **58**, 713-8.
- Erasmus, M. E., G. J. Hofstede, A. H. Petersen, J. J. Batenburg, H. P. Haagsman, S. B. Oetomo and J. Prop (2002) SP-A-enriched surfactant for treatment of rat lung transplants with SP-A deficiency after storage and reperfusion. *Transplantation.* **73**, 348-52.
- Erasmus, M. E., G. J. Hofstede, A. H. Petersen, H. P. Haagsman, S. B. Oetomo and J. Prop (1997) Effects of early surfactant treatment persisting for one week after lung transplantation in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* **156**, 567-72.
- Erasmus, M. E., A. H. Petersen, S. B. Oetomo and J. Prop (1994) The function of surfactant is impaired during the reimplantation response in rat lung transplants. *J Heart Lung Transplant.* **13**, 791-802.
- Erdogan, M., J. R. Wright, Jr. and V. C. McAlister (2002) Liposomal tacrolimus lotion as a novel topical agent for treatment of immune-mediated skin disorders: experimental studies in a murine model. *Br J Dermatol.* **146**, 964-7.
- Ewing, C. K., D. M. Duffy and J. M. Roberts (1992) Characterization of the beta-adrenergic receptor in isolated human fetal lung type II cells. *Pediatr Res.* **32**, 350-5.
- Fan, Y., Y. B. Xiao and Y. G. Weng (2009) Tacrolimus versus cyclosporine for adult lung transplant recipients: a meta-analysis. *Transplant Proc.* **41**, 1821-4.
- Fehrenbach, H. (2001) Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res.* **2**, 33-46.
- Feske, S., H. Okamura, P. G. Hogan and A. Rao (2003) Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun.* **311**, 1117-32.
- Fisher, J. H. and R. Mason (1995) Expression of pulmonary surfactant protein D in rat gastric mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **12**, 13-8.
- Floros, J., S. DiAngelo, M. Koptides, A. M. Karinch, P. K. Rogan, H. Nielsen, R. G. Spragg, K. Watterberg and G. Deiter (1996) Human SP-A locus: allele frequencies and linkage disequilibrium between the two surfactant protein A genes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **15**, 489-98.
- Floros, J. and R. R. Hoover (1998) Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D. *Biochim Biophys Acta.* **1408**, 312-22.
- Frerking, I., A. Gunther, W. Seeger and U. Pison (2001) Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med.* **27**, 1699-717.
- Frick, M., C. Bertocchi, P. Jennings, T. Haller, N. Mair, W. Singer, W. Pfaller, M. Ritsch-Marte and P. Dietl (2004) Ca²⁺ entry is essential for cell strain-induced lamellar body fusion in isolated rat type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **286**, L210-20.
- Frick, M., S. Eschertzhuber, T. Haller, N. Mair and P. Dietl (2001) Secretion in alveolar type II cells at the interface of constitutive and regulated exocytosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **25**, 306-15.

- Fruman, D. A., C. B. Klee, B. E. Bierer and S. J. Burakoff (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**, 3686-90.
- Galat, A. (2003) Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem*. **3**, 1315-47.
- Ganter, C. C., S. M. Jakob and J. Takala (2006) Pulmonary capillary pressure. A review. *Minerva Anesthesiol*. **72**, 21-36.
- Garcia-Verdugo, I., F. Sanchez-Barbero, F. U. Bosch, W. Steinhilber and C. Casals (2003) Effect of hydroxylation and N187-linked glycosylation on molecular and functional properties of recombinant human surfactant protein A. *Biochemistry*. **42**, 9532-42.
- Garcia-Verdugo, I., F. Sanchez-Barbero, K. Soldau, P. S. Tobias and C. Casals (2005) Interaction of SP-A (surfactant protein A) with bacterial rough lipopolysaccharide (Re-LPS), and effects of SP-A on the binding of Re-LPS to CD14 and LPS-binding protein. *Biochem J*. **391**, 115-24.
- Garcia-Verdugo, I., G. Wang, J. Floros and C. Casals (2002) Structural analysis and lipid-binding properties of recombinant human surfactant protein a derived from one or both genes. *Biochemistry*. **41**, 14041-53.
- Gardai, S. J., Y. Q. Xiao, M. Dickinson, J. A. Nick, D. R. Voelker, K. E. Greene and P. M. Henson (2003) By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*. **115**, 13-23.
- Gekle, M., K. Drumm, S. Mildenberger, R. Freudinger, B. Gassner and S. Silbernagl (1999) Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum. *J Physiol*. **520 Pt 3**, 709-21.
- Germann, U. A. (1996) P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer*. **32A**, 927-44.
- Geudens, N., B. M. Vanaudenaerde, A. P. Neyrinck, C. Van De Wauwer, R. Vos, G. M. Verleden, E. Verbeken, T. Lerut and D. E. Van Raemdonck (2007) The importance of lymphocytes in lung ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. **39**, 2659-62.
- Giordani, F., A. Benetolli, L. A. Favero-Filho, K. C. Lima, L. Cestari Junior and H. Milani (2003) Tacrolimus (FK506) reduces ischemia-induced hippocampal damage in rats: a 7- and 30-day study. *Braz J Med Biol Res*. **36**, 495-502.
- Glasser, S. W., M. S. Burhans, S. K. Eszterhas, M. D. Bruno and T. R. Korfhagen (2000) Human SP-C gene sequences that confer lung epithelium-specific expression in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **278**, L933-45.
- Glasser, S. W., T. R. Korfhagen, C. M. Perme, T. J. Pilot-Matias, S. E. Kister and J. A. Whitsett (1988) Two SP-C genes encoding human pulmonary surfactant proteolipid. *J Biol Chem*. **263**, 10326-31.
- Glasser, S. W., A. P. Senft, J. A. Whitsett, M. D. Maxfield, G. F. Ross, T. R. Richardson, D. R. Prows, Y. Xu and T. R. Korfhagen (2008) Macrophage dysfunction and susceptibility to pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in surfactant protein C-deficient mice. *J Immunol*. **181**, 621-8.
- Glasser, S. W., T. L. Witt, A. P. Senft, J. E. Baatz, D. Folger, M. D. Maxfield, H. T. Akinbi, D. A. Newton, D. R. Prows and T. R. Korfhagen (2009) Surfactant protein C-deficient mice are susceptible to respiratory syncytial virus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **297**, L64-72.

- Goerke, J. (1998) Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta*. **1408**, 79-89.
- Goggel, R., S. Winoto-Morbach, G. Vielhaber, Y. Imai, K. Lindner, L. Brade, H. Brade, S. Ehlers, A. S. Slutsky, S. Schutze, E. Gulbins and S. Uhlig (2004) PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med*. **10**, 155-60.
- Gonzales, L. W., S. H. Guttentag, K. C. Wade, A. D. Postle and P. L. Ballard (2002) Differentiation of human pulmonary type II cells in vitro by glucocorticoid plus cAMP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **283**, L940-51.
- Gothel, S. F. and M. A. Marahiel (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci*. **55**, 423-36.
- Gould, J. M. and J. N. Weiser (2001) Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infect Immun*. **69**, 1747-54.
- Gribar, J. J., M. Ramachandra, C. A. Hrycyna, S. Dey and S. V. Ambudkar (2000) Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system. *J Membr Biol*. **173**, 203-14.
- Griese, M. (2002) Respiratory syncytial virus and pulmonary surfactant. *Viral Immunol*. **15**, 357-63.
- Gummert, J. F., T. Ikonen and R. E. Morris (1999) Newer immunosuppressive drugs: a review. *J Am Soc Nephrol*. **10**, 1366-80.
- Gunasekara, L., S. Schurch, W. M. Schoel, K. Nag, Z. Leonenko, M. Haufs and M. Amrein (2005) Pulmonary surfactant function is abolished by an elevated proportion of cholesterol. *Biochim Biophys Acta*. **1737**, 27-35.
- Gustafsson, M., W. J. Griffiths, E. Furusjo and J. Johansson (2001) The palmitoyl groups of lung surfactant protein C reduce unfolding into a fibrillogenic intermediate. *J Mol Biol*. **310**, 937-50.
- Gustafsson, M., M. Palmblad, T. Curstedt, J. Johansson and S. Schurch (2000) Palmitoylation of a pulmonary surfactant protein C analogue affects the surface associated lipid reservoir and film stability. *Biochim Biophys Acta*. **1466**, 169-78.
- Haagsman, H. P., S. Hawgood, T. Sargeant, D. Buckley, R. T. White, K. Drickamer and B. J. Benson (1987) The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem*. **262**, 13877-80.
- Haagsman, H. P., T. Sargeant, P. V. Hauschka, B. J. Benson and S. Hawgood (1990) Binding of calcium to SP-A, a surfactant-associated protein. *Biochemistry*. **29**, 8894-900.
- Haagsman, H. P., R. T. White, J. Schilling, K. Lau, B. J. Benson, J. Golden, S. Hawgood and J. A. Clements (1989) Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A. *Am J Physiol*. **257**, L421-9.
- Hakansson, K., N. K. Lim, H. J. Hoppe and K. B. Reid (1999) Crystal structure of the trimeric alpha-helical coiled-coil and the three lectin domains of human lung surfactant protein D. *Structure*. **7**, 255-64.
- Haller, T., P. Dietl, H. Stockner, M. Frick, N. Mair, I. Tinhofer, A. Ritsch, G. Enhorning and G. Putz (2004) Tracing surfactant transformation from cellular release to insertion into an air-liquid interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **286**, L1009-15.
- Halloran, P. F., L. Kung and J. Noujaim (1998) Calcineurin and the biological effect of cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc*. **30**, 2167-70.

- Hamalainen, M., A. Lahti and E. Moilanen (2002) Calcineurin inhibitors, cyclosporin A and tacrolimus inhibit expression of inducible nitric oxide synthase in colon epithelial and macrophage cell lines. *Eur J Pharmacol.* **448**, 239-44.
- Harding, M. W., A. Galat, D. E. Uehling and S. L. Schreiber (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature.* **341**, 758-60.
- Hartkoorn, R. C., B. Chandler, A. Owen, S. A. Ward, S. Bertel Squire, D. J. Back and S. H. Khoo (2007) Differential drug susceptibility of intracellular and extracellular tuberculosis, and the impact of P-glycoprotein. *Tuberculosis (Edinb).* **87**, 248-55.
- Hass, R., G. Lonnemann, D. Mannel, N. Topley, A. Hartmann, L. Kohler, K. Resch and M. Goppelt-Strube (1991) Regulation of TNF-alpha, IL-1 and IL-6 synthesis in differentiating human monoblastoid leukemic U937 cells. *Leuk Res.* **15**, 327-39.
- Hausen, B., R. Rohde, C. W. Hewitt, F. Schroeder, M. Beuke, R. Ramsamooj, H. J. Schafers and H. G. Borst (1997) Exogenous surfactant treatment before and after sixteen hours of ischemia in experimental lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **113**, 1050-8.
- Hawco, M. W., P. J. Davis and K. M. Keough (1981) Lipid fluidity in lung surfactant: monolayers of saturated and unsaturated lecithins. *J Appl Physiol.* **51**, 509-15.
- Hawgood, S. (1997) Surfactant: Composition, structure and metabolism. *Lung*. Crystal, R. G., Weibel, E. R. and Barnes, P. J. (eds.), Lippincott-Raven, Philadelphia
- Hawgood, S. and F. R. Poulain (2001) The pulmonary collectins and surfactant metabolism. *Annu Rev Physiol.* **63**, 495-519.
- Head, J. F., T. R. Mealy, F. X. McCormack and B. A. Seaton (2003) Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A. *J Biol Chem.* **278**, 43254-60.
- Hemenway, C. S. and J. Heitman (1999) Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys.* **30**, 115-51.
- Hickman-Davis, J., J. Gibbs-Erwin, J. R. Lindsey and S. Matalon (1999) Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 4953-8.
- Hicks, M., A. Hing, L. Gao, J. Ryan and P. S. Macdonald (2006) Organ preservation. *Methods Mol Biol.* **333**, 331-74.
- Hohlfeld, J., H. Fabel and H. Hamm (1997) The role of pulmonary surfactant in obstructive airways disease. *Eur Respir J.* **10**, 482-91.
- Hohlfeld, J. M., M. Struber, K. Ahlf, M. M. Hoeper, S. Fraund, N. Krug, G. Warnecke, W. Harringer, A. Haverich and H. Fabel (1999) Exogenous surfactant improves survival and surfactant function in ischaemia-reperfusion injury in minipigs. *Eur Respir J.* **13**, 1037-43.
- Hohlfeld, J. M., E. Tiryaki, H. Hamm, H. G. Hoymann, N. Krug, A. Haverich and H. Fabel (1998) Pulmonary surfactant activity is impaired in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med.* **158**, 706-12.
- Holmskov, U., S. B. Laursen, R. Malhotra, H. Wiedemann, R. Timpl, G. R. Stuart, I. Tornoe, P. S. Madsen, K. B. Reid and J. C. Jensenius (1995) Comparative study of the structural and functional properties of a bovine plasma C-type lectin, collectin-43, with other collectins. *Biochem J.* **305 (Pt 3)**, 889-96.
- Hollo, Z., L. Homolya, C. W. Davis and B. Sarkadi (1994) Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta.* **1191**, 384-8.

- Hook, G. E., J. W. Spalding, M. J. Ortner, E. G. Tombropoulos and C. F. Chignell (1984) Investigation of phospholipids of the pulmonary extracellular lining by electron paramagnetic resonance. The effects of phosphatidylglycerol and unsaturated phosphatidylcholines on the fluidity of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biochem J.* **223**, 533-42.
- Horowitz, A. D., B. Moussavian and J. A. Whitsett (1996) Roles of SP-A, SP-B, and SP-C in modulation of lipid uptake by pulmonary epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* **270**, L69-79.
- Huwyler, J., A. Cerletti, G. Fricker, A. N. Eberle and J. Drewe (2002) By-passing of P-glycoprotein using immunoliposomes. *J Drug Target.* **10**, 73-9.
- Iacono, A. T., B. A. Johnson, W. F. Grgurich, J. G. Youssef, T. E. Corcoran, D. A. Seiler, J. H. Dauber, G. C. Smaldone, A. Zeevi, S. A. Yousem, J. J. Fung, G. J. Burckart, K. R. McCurry and B. P. Griffith (2006) A randomized trial of inhaled cyclosporine in lung-transplant recipients. *N Engl J Med.* **354**, 141-50.
- Ide, N., T. Nagayasu, K. Matsumoto, T. Tagawa, K. Tanaka, T. Taguchi, Y. Sumida and M. Nakashima (2007) Efficacy and safety of inhaled tacrolimus in rat lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **133**, 548-53.
- Ikegami, M., T. R. Korfhagen, J. A. Whitsett, M. D. Bruno, S. E. Wert, K. Wada and A. H. Jobe (1998) Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *Am J Physiol.* **275**, L247-54.
- Ikegami, M., T. D. Le Cras, W. D. Hardie, M. T. Stahlman, J. A. Whitsett and T. R. Korfhagen (2005a) TGF- α perturbs surfactant homeostasis in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **289**, L34-43.
- Ikegami, M., C. L. Na, T. R. Korfhagen and J. A. Whitsett (2005b) Surfactant protein D influences surfactant ultrastructure and uptake by alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **288**, L552-61.
- Ingu, A., K. Komatsu, S. Ichimiya, N. Sato, Y. Hirayama, M. Morikawa and T. Abe (2005) Effects of inhaled FK 506 on the suppression of acute rejection after lung transplantation: use of a rat orthotopic lung transplantation model. *J Heart Lung Transplant.* **24**, 538-43.
- Iwasaki, K. (2007) Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet.* **22**, 328-35.
- Janmey, P. A. (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev.* **78**, 763-81.
- Johansson, H., K. Nordling, T. E. Weaver and J. Johansson (2006) The Brichos domain-containing C-terminal part of pro-surfactant protein C binds to an unfolded poly-val transmembrane segment. *J Biol Chem.* **281**, 21032-9.
- Johansson, J. (1998) Structure and properties of surfactant protein C. *Biochim Biophys Acta.* **1408**, 161-72.
- Johansson, J. and T. Curstedt (1997) Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem.* **244**, 675-93.
- Johansson, J., T. Szyperski, T. Curstedt and K. Wuthrich (1994) The NMR structure of the pulmonary surfactant-associated polypeptide SP-C in an apolar solvent contains a valyl-rich α -helix. *Biochemistry.* **33**, 6015-23.
- Kang, C. B., Y. Hong, S. Dhe-Paganon and H. S. Yoon (2008) FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals.* **16**, 318-25.
- Kang, D. I., H. K. Kang, H. S. Gwak, H. K. Han and S. J. Lim (2009) Liposome composition is important for retention of liposomal rhodamine in P-glycoprotein-overexpressing cancer cells. *Drug Deliv.* **16**, 261-7.

- Kang, Y. J., B. Kusler, M. Otsuka, M. Hughes, N. Suzuki, S. Suzuki, W. C. Yeh, S. Akira, J. Han and P. P. Jones (2007) Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways. *J Immunol.* **179**, 4598-607.
- Keller, A., H. R. Eistetter, T. Voss and K. P. Schafer (1991) The pulmonary surfactant protein C (SP-C) precursor is a type II transmembrane protein. *Biochem J.* **277** (Pt 2), 493-9.
- Kim, Y., J. S. Moon, K. S. Lee, S. Y. Park, J. Cheong, H. S. Kang, H. Y. Lee and H. D. Kim (2004) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates the expression of iNOS through IKK and NF-kappaB activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages and RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **314**, 695-703.
- King, R. J. and J. A. Clements (1972) Surface active materials from dog lung. 3. Thermal analysis. *Am J Physiol.* **223**, 727-33.
- King, R. J., M. C. Phillips, P. M. Horowitz and S. C. Dang (1986) Interaction between the 35 kDa apolipoprotein of pulmonary surfactant and saturated phosphatidylcholines. Effects of temperature. *Biochim Biophys Acta.* **879**, 1-13.
- Kino, T. and T. Goto (1993) Discovery of FK-506 and update. *Ann N Y Acad Sci.* **685**, 13-21.
- Kissinger, C. R., H. E. Parge, D. R. Knighton, C. T. Lewis, L. A. Pelletier, A. Tempczyk, V. J. Kalish, K. D. Tucker, R. E. Showalter, E. W. Moomaw and et al. (1995) Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature.* **378**, 641-4.
- Kitahara, K. and S. Kawai (2007) Cyclosporine and tacrolimus for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* **19**, 238-45.
- Ko, S., Y. Nakajima, H. Kanehiro, M. Horikawa, A. Yoshimura, J. Taki, Y. Aomatsu, T. Kin, K. Yagura and H. Nakano (1995) The enhanced immunosuppressive efficacy of newly developed liposomal FK506 in canine liver transplantation. *Transplantation.* **59**, 1384-8.
- Kobayashi, T., T. Ishida, Y. Okada, S. Ise, H. Harashima and H. Kiwada (2007) Effect of transferrin receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistant tumor cells. *Int J Pharm.* **329**, 94-102.
- Koletsis, E., A. Chatzimichalis, V. Fotopoulos, K. Kokkinis, E. Papadimitriou, D. Tiniakos, E. Marinos, I. Bellenis and D. Dougenis (2003) Donor lung pretreatment with surfactant in experimental transplantation preserves graft hemodynamics and alveolar morphology. *Exp Biol Med (Maywood).* **228**, 540-5.
- Korfhagen, T. R., M. D. Bruno, G. F. Ross, K. M. Huelsman, M. Ikegami, A. H. Jobe, S. E. Wert, B. R. Stripp, R. E. Morris, S. W. Glasser, C. J. Bachurski, H. S. Iwamoto and J. A. Whitsett (1996) Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 9594-9.
- Korimilli, A., L. W. Gonzales and S. H. Guttentag (2000) Intracellular localization of processing events in human surfactant protein B biosynthesis. *J Biol Chem.* **275**, 8672-9.
- Korutla, L. and D. S. Strayer (1999) SP-A as a cytokine: surfactant protein-A-regulated transcription of surfactant proteins and other genes. *J Cell Physiol.* **178**, 379-86.
- Krishnadasan, B., B. Naidu, M. Rosengart, A. L. Farr, A. Barnes, E. D. Verrier and M. S. Mulligan (2002) Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of cyclosporine and tacrolimus. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **123**, 756-67.
- Kuroki, Y. and T. Akino (1991) Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem.* **266**, 3068-73.

- Kuzmenko, A. I., H. Wu and F. X. McCormack (2006) Pulmonary collectins selectively permeabilize model bacterial membranes containing rough lipopolysaccharide. *Biochemistry*. **45**, 2679-85.
- Lambrecht, B. N. (2006) Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*. **24**, 366-8.
- Lang, C. J., A. D. Postle, S. Orgeig, F. Possmayer, W. Bernhard, A. K. Panda, K. D. Jurgens, W. K. Milsom, K. Nag and C. B. Daniels (2005) Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **289**, R1426-39.
- Lawson, P. R. and K. B. Reid (2000) The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol Rev*. **173**, 66-78.
- Lee, J. C. and J. D. Christie (2009) Primary graft dysfunction. *Proc Am Thorac Soc*. **6**, 39-46.
- LeVine, A. M., M. D. Bruno, K. M. Huelsman, G. F. Ross, J. A. Whitsett and T. R. Korfhagen (1997) Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol*. **158**, 4336-40.
- LeVine, A. M., K. E. Kurak, J. R. Wright, W. T. Watford, M. D. Bruno, G. F. Ross, J. A. Whitsett and T. R. Korfhagen (1999) Surfactant protein-A binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **20**, 279-86.
- Lewis, J. F., M. Ikegami and A. H. Jobe (1990) Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *J Appl Physiol*. **69**, 2303-10.
- Liepinsh, E., M. Andersson, J. M. Ruysschaert and G. Otting (1997) Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat Struct Biol*. **4**, 793-5.
- Lin, S., H. T. Akinbi, J. S. Breslin and T. E. Weaver (1996) Structural requirements for targeting of surfactant protein B (SP-B) to secretory granules in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. **271**, 19689-95.
- Linfert, D., T. Chowdhry and H. Rabb (2009) Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando)*. **23**, 1-10.
- Linke, M. J., C. E. Harris, T. R. Korfhagen, F. X. McCormack, A. D. Ashbaugh, P. Steele, J. A. Whitsett and P. D. Walzer (2001) Immunosuppressed surfactant protein A-deficient mice have increased susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection. *J Infect Dis*. **183**, 943-52.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. **193**, 265-75.
- Lu, J., C. Teh, U. Kishore and K. B. Reid (2002) Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta*. **1572**, 387-400.
- Lukacs, G. L., O. D. Rotstein and S. Grinstein (1990) Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem*. **265**, 21099-107.
- Madan, T., P. Eggleton, U. Kishore, P. Strong, S. S. Aggrawal, P. U. Sarma and K. B. Reid (1997) Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun*. **65**, 3171-9.
- Madsen, J., I. Tornoe, O. Nielsen, C. Koch, W. Steinhilber and U. Holmskov (2003) Expression and localization of lung surfactant protein A in human tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **29**, 591-7.
- Malik, A. B. (1985) Mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *Circ Res*. **57**, 1-18.

- Mamot, C., D. C. Drummond, K. Hong, D. B. Kirpotin and J. W. Park (2003) Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. *Drug Resist Updat.* **6**, 271-9.
- Martin, S. F., I. Buron, J. C. Espinosa, J. Castilla, J. M. Villalba and J. M. Torres (2007) Coenzyme Q and protein/lipid oxidation in a BSE-infected transgenic mouse model. *Free Radic Biol Med.* **42**, 1723-9.
- Maruscak, A. A., D. W. Vockeroth, B. Girardi, T. Sheikh, F. Possmayer, J. F. Lewis and R. A. Veldhuizen (2008) Alterations to surfactant precede physiological deterioration during high tidal volume ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **294**, L974-83.
- Masuda, S. and K. Inui (2006) An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther.* **112**, 184-98.
- Matsuda, S., F. Shibasaki, K. Takehana, H. Mori, E. Nishida and S. Koyasu (2000) Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep.* **1**, 428-34.
- Matthay, M. A., L. Robriquet and X. Fang (2005) Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. *Proc Am Thorac Soc.* **2**, 206-13.
- Mattila, P. S., K. S. Ullman, S. Fiering, E. A. Emmel, M. McCutcheon, G. R. Crabtree and L. A. Herzenberg (1990) The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J.* **9**, 4425-33.
- Mbawuike, I. N. and H. B. Herscovitz (1989) MH-S, a murine alveolar macrophage cell line: morphological, cytochemical, and functional characteristics. *J Leukoc Biol.* **46**, 119-27.
- McCormack, F. X. (1998) Structure, processing and properties of surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta.* **1408**, 109-31.
- McCormack, F. X., M. Damodarasamy and B. M. Elhalwagi (1999) Deletion mapping of N-terminal domains of surfactant protein A. The N-terminal segment is required for phospholipid aggregation and specific inhibition of surfactant secretion. *J Biol Chem.* **274**, 3173-81.
- McCormack, F. X., S. Pattanajitvilai, J. Stewart, F. Possmayer, K. Inchley and D. R. Voelker (1997) The Cys6 intermolecular disulfide bond and the collagen-like region of rat SP-A play critical roles in interactions with alveolar type II cells and surfactant lipids. *J Biol Chem.* **272**, 27971-9.
- McCormack, F. X. and J. A. Whitsett (2002) The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest.* **109**, 707-12.
- McCourtie, A. S., A. S. Farivar, S. M. Woolley, H. E. Merry, P. S. Wolf, B. Mackinnon-Patterson, J. C. Keech, E. Fitzsullivan and M. S. Mulligan (2008a) Alveolar macrophage secretory products effect type 2 pneumocytes undergoing hypoxia-reoxygenation. *Ann Thorac Surg.* **86**, 1774-9.
- McCourtie, A. S., H. E. Merry, A. S. Farivar, C. H. Goss and M. S. Mulligan (2008b) Alveolar macrophage secretory products augment the response of rat pulmonary artery endothelial cells to hypoxia and reoxygenation. *Ann Thorac Surg.* **85**, 1056-60.
- Meyboom, A., D. Maretzki, P. A. Stevens and K. P. Hofmann (1999) Interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid liposomes: a kinetic study on head group and fatty acid specificity. *Biochim Biophys Acta.* **1441**, 23-35.
- Moffatt, S. D., V. McAlister, R. Y. Calne and S. M. Metcalfe (1999) Potential for improved therapeutic index of FK506 in liposomal formulation demonstrated in a mouse cardiac allograft model. *Transplantation.* **67**, 1205-8.

- Mollenhauer, H. H., D. J. Morre and L. D. Rowe (1990) Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta*. **1031**, 225-46.
- Monaghan, P. and A. Bell (2005) A Plasmodium falciparum FK506-binding protein (FKBP) with peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and chaperone activities. *Mol Biochem Parasitol*. **139**, 185-95.
- Moulakakis, C., S. Adam, U. Seitzer, A. B. Schromm, M. Leitges and C. Stamme (2007) Surfactant protein A activation of atypical protein kinase C zeta in IkappaB-alpha-dependent anti-inflammatory immune regulation. *J Immunol*. **179**, 4480-91.
- Moulakakis, C. and C. Stamme (2009) Role of clathrin-mediated endocytosis of surfactant protein A by alveolar macrophages in intracellular signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **296**, L430-41.
- Mulugeta, S. and M. F. Beers (2003) Processing of surfactant protein C requires a type II transmembrane topology directed by juxtamembrane positively charged residues. *J Biol Chem*. **278**, 47979-86.
- Munford, R. S., P. O. Sheppard and P. J. O'Hara (1995) Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res*. **36**, 1653-63.
- Nag, K., A. Hillier, K. Parsons and M. F. Garcia (2007) Interactions of serum with lung surfactant extract in the bronchiolar and alveolar airway models. *Respir Physiol Neurobiol*. **157**, 411-24.
- Naidu, B. V., B. Krishnadasan, A. S. Farivar, S. M. Woolley, R. Thomas, N. Van Rooijen, E. D. Verrier and M. S. Mulligan (2003) Early activation of the alveolar macrophage is critical to the development of lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **126**, 200-7.
- Naidu, B. V., S. M. Woolley, A. S. Farivar, R. Thomas, C. H. Fraga, C. H. Goss and M. S. Mulligan (2004) Early tumor necrosis factor-alpha release from the pulmonary macrophage in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **127**, 1502-8.
- Nogee, L. M., D. E. de Mello, L. P. Dehner and H. R. Colten (1993) Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. **328**, 406-10.
- Nogee, L. M., A. E. Dunbar, 3rd, S. Wert, F. Askin, A. Hamvas and J. A. Whitsett (2002) Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest*. **121**, 20S-21S.
- Nogee, L. M., S. E. Wert, S. A. Proffitt, W. M. Hull and J. A. Whitsett (2000) Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. **161**, 973-81.
- Novick, R. J., J. MacDonald, R. A. Veldhuizen, F. Wan, J. Duplan, L. Denning, F. Possmayer, A. A. Gilpin, L. J. Yao, D. Bjarneson and J. F. Lewis (1996) Evaluation of surfactant treatment strategies after prolonged graft storage in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. **154**, 98-104.
- Ogasawara, Y. and D. R. Voelker (1995) The role of the amino-terminal domain and the collagenous region in the structure and the function of rat surfactant protein D. *J Biol Chem*. **270**, 19052-8.
- Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A., H. P. Haagsman, L. M. van Golde and R. A. Demel (1991) Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biochemistry*. **30**, 10965-71.

- Palaniyar, N., M. Ikegami, T. Korfhagen, J. Whitsett and F. X. McCormack (2001) Domains of surfactant protein A that affect protein oligomerization, lipid structure and surface tension. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **129**, 109-27.
- Palaniyar, N., R. A. Ridsdale, S. A. Hearn, F. Possmayer and G. Haraux (1999) Formation of membrane lattice structures and their specific interactions with surfactant protein A. *Am J Physiol.* **276**, L642-9.
- Palaniyar, N., R. A. Ridsdale, C. E. Holterman, K. Inchley, F. Possmayer and G. Haraux (1998) Structural changes of surfactant protein A induced by cations reorient the protein on lipid bilayers. *J Struct Biol.* **122**, 297-310.
- Pastrana-Rios, B., S. Taneva, K. M. Keough, A. J. Mautone and R. Mendelsohn (1995) External reflection absorption infrared spectroscopy study of lung surfactant proteins SP-B and SP-C in phospholipid monolayers at the air/water interface. *Biophys J.* **69**, 2531-40.
- Perczel, A., K. Park and G. D. Fasman (1992) Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. *Anal Biochem.* **203**, 83-93.
- Perez-Gil, J., A. Cruz and C. Casals (1993) Solubility of hydrophobic surfactant proteins in organic solvent/water mixtures. Structural studies on SP-B and SP-C in aqueous organic solvents and lipids. *Biochim Biophys Acta.* **1168**, 261-70.
- Perez-Gil, J. and K. M. Keough (1998) Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1408**, 203-17.
- Persson, A., D. Chang, K. Rust, M. Moxley, W. Longmore and E. Crouch (1989) Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein. *Biochemistry.* **28**, 6361-7.
- Petrache, I., V. Natarajan, L. Zhen, T. R. Medler, A. T. Richter, C. Cho, W. C. Hubbard, E. V. Berdyshev and R. M. Tudor (2005) Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nat Med.* **11**, 491-8.
- Pian, M. S. and L. G. Dobbs (1997) Lipoprotein-stimulated surfactant secretion in alveolar type II cells: mediation by heterotrimeric G proteins. *Am J Physiol.* **273**, L634-9.
- Piantadosi, C. A. and D. A. Schwartz (2004) The acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med.* **141**, 460-70.
- Pierre, A. F., K. N. DeCampos, M. Liu, V. Edwards, E. Cutz, A. S. Slutsky and S. H. Keshavjee (1998a) Rapid reperfusion causes stress failure in ischemic rat lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **116**, 932-42.
- Pierre, A. F., A. M. Xavier, M. Liu, S. D. Cassivi, T. F. Lindsay, H. C. Marsh, A. S. Slutsky and S. H. Keshavjee (1998b) Effect of complement inhibition with soluble complement receptor 1 on pig allotransplant lung function. *Transplantation.* **66**, 723-32.
- Plosker, G. L. and R. H. Foster (2000) Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs.* **59**, 323-89.
- Possmayer, F., K. Nag, K. Rodriguez, R. Qanbar and S. Schurch (2001) Surface activity in vitro: role of surfactant proteins. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **129**, 209-20.
- Poulain, F. R., L. Allen, M. C. Williams, R. L. Hamilton and S. Hawgood (1992) Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation. *Am J Physiol.* **262**, L730-9.

- Poulain, F. R., S. Nir and S. Hawgood (1996) Kinetics of phospholipid membrane fusion induced by surfactant apoproteins A and B. *Biochim Biophys Acta*. **1278**, 169-75.
- Presti, F. T., R. J. Pace and S. I. Chan (1982) Cholesterol-phospholipid interaction in membranes. 2. Stoichiometry and molecular packing of cholesterol-rich domains. *Biochemistry*. **21**, 3831-5.
- Quintero, O. A., T. R. Korfhagen and J. R. Wright (2002) Surfactant protein A regulates surfactant phospholipid clearance after LPS-induced injury in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **283**, L76-85.
- Ramage, L., L. Proudfoot and K. Guy (2004) Expression of C-reactive protein in human lung epithelial cells and upregulation by cytokines and carbon particles. *Inhal Toxicol*. **16**, 607-13.
- Raschke, W. C., S. Baird, P. Ralph and I. Nakoinz (1978) Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. **15**, 261-7.
- Reichenspurner, H. (2005) Overview of tacrolimus-based immunosuppression after heart or lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. **24**, 119-30.
- Rejman, J., V. Oberle, I. S. Zuhorn and D. Hoekstra (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. **377**, 159-69.
- Riordan, J. R. (1999) Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am J Hum Genet*. **64**, 1499-504.
- Rodriguez-Capote, K., D. Manzanares, T. Haines and F. Possmayer (2006) Reactive oxygen species inactivation of surfactant involves structural and functional alterations to surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biophys J*. **90**, 2808-21.
- Romero, C., E. Benito and M. A. Bosch (1995) Effect of Escherichia coli lipopolysaccharide on surfactant secretion in primary cultures of rat type II pneumocytes. *Biochim Biophys Acta*. **1256**, 305-9.
- Rooney, S. A. (2001) Regulation of surfactant secretion. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **129**, 233-43.
- Ross, G. F., J. Sawyer, T. O'Connor and J. A. Whitsett (1991) Intermolecular cross-links mediate aggregation of phospholipid vesicles by pulmonary surfactant protein SP-A. *Biochemistry*. **30**, 858-65.
- Rouser, G., A. N. Siakotos and S. Fleischer (1966) Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids*. **1**, 85-6.
- Ruano, M. L., I. Garcia-Verdugo, E. Miguel, J. Perez-Gil and C. Casals (2000) Self-aggregation of surfactant protein A. *Biochemistry*. **39**, 6529-37.
- Ruano, M. L., E. Miguel, J. Perez-Gil and C. Casals (1996) Comparison of lipid aggregation and self-aggregation activities of pulmonary surfactant-associated protein A. *Biochem J*. **313** (Pt 2), 683-9.
- Ruano, M. L., J. Perez-Gil and C. Casals (1998) Effect of acidic pH on the structure and lipid binding properties of porcine surfactant protein A. Potential role of acidification along its exocytic pathway. *J Biol Chem*. **273**, 15183-91.
- Rusnak, F. and P. Mertz (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*. **80**, 1483-521.
- Saeki, T., K. Ueda, Y. Tanigawara, R. Hori and T. Komano (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem*. **268**, 6077-80.

- Saenz, A., O. Canadas, L. A. Bagatolli, M. E. Johnson and C. Casals (2006) Physical properties and surface activity of surfactant-like membranes containing the cationic and hydrophobic peptide KL4. *FEBS J.* **273**, 2515-27.
- Saenz, A., A. Lopez-Sanchez, J. Mojica-Lazaro, L. Martinez-Caro, N. Nin, L. A. Bagatolli and C. Casals (2010) Fluidizing effects of C-reactive protein on lung surfactant membranes: protective role of surfactant protein A. *FASEB J.*
- Sanchez-Barbero, F., G. Rivas, W. Steinhilber and C. Casals (2007) Structural and functional differences among human surfactant proteins SP-A1, SP-A2 and co-expressed SP-A1/SP-A2: role of supratrimeric oligomerization. *Biochem J.* **406**, 479-89.
- Sanchez-Barbero, F., J. Strassner, R. Garcia-Canero, W. Steinhilber and C. Casals (2005) Role of the degree of oligomerization in the structure and function of human surfactant protein A. *J Biol Chem.* **280**, 7659-70.
- Sankaram, M. B. and T. E. Thompson (1991) Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 8686-90.
- Sano, H., H. Sohma, T. Muta, S. Nomura, D. R. Voelker and Y. Kuroki (1999) Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. *J Immunol.* **163**, 387-95.
- Sauna, Z. E., M. M. Smith, M. Muller, K. M. Kerr and S. V. Ambudkar (2001) The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr.* **33**, 481-91.
- Scott, L. J., K. McKeage, S. J. Keam and G. L. Plosker (2003) Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs.* **63**, 1247-97.
- Schreiber, S. L. (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science.* **251**, 283-7.
- Schrepfer, S., T. Deuse, H. Reichenspurner, J. Hoffmann, M. Haddad, J. Fink, M. P. Fischbein, R. C. Robbins and M. P. Pelletier (2007) Effect of inhaled tacrolimus on cellular and humoral rejection to prevent posttransplant obliterative airway disease. *Am J Transplant.* **7**, 1733-42.
- Schurch, S. (1982) Surface tension at low lung volumes: dependence on time and alveolar size. *Respir Physiol.* **48**, 339-55.
- Schurch, S., F. H. Green and H. Bachofen (1998) Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry. *Biochim Biophys Acta.* **1408**, 180-202.
- Sharma, A. K., L. G. Fernandez, A. S. Awad, I. L. Kron and V. E. Laubach (2007) Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF-alpha during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **293**, L105-13.
- Sinswat, P., K. A. Overhoff, J. T. McConville, K. P. Johnston and R. O. Williams, 3rd (2008) Nebulization of nanoparticulate amorphous or crystalline tacrolimus--single-dose pharmacokinetics study in mice. *Eur J Pharm Biopharm.* **69**, 1057-66.
- Sohma, H., T. Watanabe, Y. Kuroki, H. Yoshino, N. Matsushima, M. Yazawa and T. Akino (1992) Calcium dependent conformational changes of surfactant protein A (SP-A) and its collagenase resistant fragment with or without dithiothreitol. *Biochim Biophys Acta.* **1159**, 150-4.
- Spragg, R. G., J. F. Lewis, W. Wurst, D. Hafner, R. P. Baughman, M. D. Wewers and J. J. Marsh (2003) Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. *Am J Respir Crit Care Med.* **167**, 1562-6.

- Squadrito, F., D. Altavilla, G. Squadrito, A. Saitta, B. Deodato, M. Arlotta, L. Minutoli, C. Quartarone, M. Ferlito and A. P. Caputi (2000) Tacrolimus limits polymorphonuclear leucocyte accumulation and protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* **32**, 429-40.
- St Peter, S. D., A. A. Moss and D. C. Mulligan (2003a) Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl.* **9**, 105-16.
- St Peter, S. D., D. J. Post, M. I. Rodriguez-Davalos, D. D. Douglas, A. A. Moss and D. C. Mulligan (2003b) Tacrolimus as a liver flush solution to ameliorate the effects of ischemia/reperfusion injury following liver transplantation. *Liver Transpl.* **9**, 144-9.
- Struber, M., S. Fischer, J. Niedermeyer, G. Warnecke, B. Gohrbandt, A. Gorler, A. R. Simon, A. Haverich and J. M. Hohlfeld (2007) Effects of exogenous surfactant instillation in clinical lung transplantation: a prospective, randomized trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **133**, 1620-5.
- Sun, B., T. Curstedt, G. Lindgren, B. Franzen, A. A. Alaiya, A. Calkovska and B. Robertson (1997) Biophysical and physiological properties of a modified porcine surfactant enriched with surfactant protein A. *Eur Respir J.* **10**, 1967-74.
- Sundstrom, C. and K. Nilsson (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* **17**, 565-77.
- Suzuki, Y., Y. Fujita and K. Kogishi (1989) Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis.* **140**, 75-81.
- Taimi, M., J. Dornand, M. Nicolas, J. Marti and J. Favero (1994) Involvement of CD4 in interleukin-6 secretion by U937 monocytic cells stimulated with the lectin jacalin. *J Leukoc Biol.* **55**, 214-20.
- Taneva, S. G. and K. M. Keough (1994) Dynamic surface properties of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochemistry.* **33**, 14660-70.
- Tapper, H. and R. Sundler (1995) Bafilomycin A1 inhibits lysosomal, phagosomal, and plasma membrane H(+)-ATPase and induces lysosomal enzyme secretion in macrophages. *J Cell Physiol.* **163**, 137-44.
- Tapuria, N., Y. Kumar, M. M. Habib, M. Abu Amara, A. M. Seifalian and B. R. Davidson (2008) Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. *J Surg Res.* **150**, 304-30.
- Timmerman, L. A., N. A. Clipstone, S. N. Ho, J. P. Northrop and G. R. Crabtree (1996) Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature.* **383**, 837-40.
- Tokieda, K., J. A. Whitsett, J. C. Clark, T. E. Weaver, K. Ikeda, K. B. McConnell, A. H. Jobe, M. Ikegami and H. S. Iwamoto (1997) Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice. *Am J Physiol.* **273**, L875-82.
- Trapnell, B. C. and J. A. Whitsett (2002) Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol.* **64**, 775-802.
- Trapnell, B. C., J. A. Whitsett and K. Nakata (2003) Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* **349**, 2527-39.
- Tsai, E. Y., J. V. Falvo, A. V. Tsytsykova, A. K. Barczak, A. M. Reimold, L. H. Glimcher, M. J. Fenton, D. C. Gordon, I. F. Dunn and A. E. Goldfeld (2000) A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and

- CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol.* **20**, 6084-94.
- Valino, F., C. Casals, R. Guerrero, L. Alvarez, M. Santos, A. Saenz, A. Varela, M. A. Claro, F. Tendillo and J. L. Castillo-Olivares (2004) Inhaled nitric oxide affects endogenous surfactant in experimental lung transplantation. *Transplantation.* **77**, 812-8.
- van der Kaaij, N. P., J. Kluin, J. J. Haitsma, M. A. den Bakker, B. N. Lambrecht, B. Lachmann, R. W. de Bruin and A. J. Bogers (2008) Ischemia of the lung causes extensive long-term pulmonary injury: an experimental study. *Respir Res.* **9**, 28.
- van der Kaaij, N. P., J. Kluin, J. J. Haitsma, M. A. den Bakker, B. N. Lambrecht, B. Lachmann, R. W. de Bruin and A. J. Bogers (2009) Surfactant pretreatment decreases long-term damage after ischemia-reperfusion injury of the lung. *Eur J Cardiothorac Surg.* **35**, 304-12; discussion 312.
- Van Duyne, G. D., R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber and J. Clardy (1991) Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science.* **252**, 839-42.
- Van Golde, L. G. M. and C. Casals (1997) Metabolism of lipids. *Lung*. Crystal, R. G., Weibel, E. R. and Barnes, P. J. (eds.), Lippincott-Raven, Philadelphia
- Van Golde, L. M., J. J. Batenburg and B. Robertson (1988) The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol Rev.* **68**, 374-455.
- Van Iwaarden, J. F., J. C. Pikaar, J. Storm, E. Brouwer, J. Verhoef, R. S. Oosting, L. M. van Golde and J. A. van Strijp (1994) Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem J.* **303** (Pt 2), 407-11.
- van Iwaarden, J. F., J. A. van Strijp, M. J. Ebskamp, A. C. Welmers, J. Verhoef and L. M. van Golde (1991) Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol.* **261**, L204-9.
- van Putte, B. P., P. M. Cobelens, N. van der Kaaij, B. Lachmann, A. Kavelaars, C. J. Heijnen and J. Kesecioglu (2009) Exogenous surfactant attenuation of ischemia-reperfusion injury in the lung through alteration of inflammatory and apoptotic factors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **137**, 824-8.
- Van Putte, B. P., J. Kesecioglu, J. M. Hendriks, V. P. Persy, E. van Marck, P. E. Van Schil and M. E. De Broe (2005) Cellular infiltrates and injury evaluation in a rat model of warm pulmonary ischemia-reperfusion. *Crit Care.* **9**, R1-8.
- Vandenbussche, G., A. Clercx, M. Clercx, T. Curstedt, J. Johansson, H. Jornvall and J. M. Ruysschaert (1992) Secondary structure and orientation of the surfactant protein SP-B in a lipid environment. A Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry.* **31**, 9169-76.
- Varela, A., C. G. Montero, M. Cordoba, A. Antequera, M. Perez, M. J. Tabuenca, J. Ortiz Berrocal, F. J. Tendillo, A. Mascias, M. Santos and J. L. Castillo Olivares (1997) Improved distribution of pulmonary flush solution to the tracheobronchial wall in pulmonary transplantation. *Eur Surg Res.* **29**, 1-4.
- Vazquez de Lara, L., C. Becerril, M. Montano, C. Ramos, V. Maldonado, J. Melendez, D. S. Phelps, A. Pardo and M. Selman (2000) Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **279**, L950-7.
- Veldhuizen, E. J. and H. P. Haagsman (2000) Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta.* **1467**, 255-70.
- Veldhuizen, R., K. Nag, S. Orgeig and F. Possmayer (1998) The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta.* **1408**, 90-108.

- Veldhuizen, R. A., J. Lee, D. Sandler, W. Hull, J. A. Whitsett, J. Lewis, F. Possmayer and R. J. Novick (1993) Alterations in pulmonary surfactant composition and activity after experimental lung transplantation. *Am Rev Respir Dis.* **148**, 208-15.
- Veldhuizen, R. A., L. J. Yao, S. A. Hearn, F. Possmayer and J. F. Lewis (1996) Surfactant-associated protein A is important for maintaining surfactant large-aggregate forms during surface-area cycling. *Biochem J.* **313** (Pt 3), 835-40.
- Venkataramanan, R., A. Swaminathan, T. Prasad, A. Jain, S. Zuckerman, V. Warty, J. McMichael, J. Lever, G. Burckart and T. Starzl (1995) Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* **29**, 404-30.
- Vorbroker, D. K., S. A. Profitt, L. M. Nogee and J. A. Whitsett (1995) Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. *Am J Physiol.* **268**, L647-56.
- Voss, T., H. Eistetter, K. P. Schafer and J. Engel (1988) Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36. Structural homology with the complement factor C1q. *J Mol Biol.* **201**, 219-27.
- Wadsworth, S. J. and A. Chander (2000) H⁺-and K⁺-dependence of Ca²⁺ uptake in lung lamellar bodies. *J Membr Biol.* **174**, 41-51.
- Wagner, J. G. and R. A. Roth (2000) Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev.* **52**, 349-74.
- Wang, T., P. K. Donahoe and A. S. Zervos (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science.* **265**, 674-6.
- Wang, Z., A. L. Schwan, L. L. Lairson, J. S. O'Donnell, G. F. Byrne, A. Foye, B. A. Holm and R. H. Notter (2003) Surface activity of a synthetic lung surfactant containing a phospholipase-resistant phosphonolipid analog of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **285**, L550-9.
- Watts, A. B., A. M. Cline, A. R. Saad, S. B. Johnson, J. I. Peters and R. O. Williams, 3rd (2010) Characterization and pharmacokinetic analysis of tacrolimus dispersion for nebulization in a lung transplanted rodent model. *Int J Pharm.* **384**, 46-52.
- Weaver, T. E. (1998) Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim Biophys Acta.* **1408**, 173-9.
- Weaver, T. E. and J. J. Conkright (2001) Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol.* **63**, 555-78.
- Weaver, T. E., C. L. Na and M. Stahlman (2002) Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin Cell Dev Biol.* **13**, 263-70.
- Weikert, L. F., K. Edwards, Z. C. Chroneos, C. Hager, L. Hoffman and V. L. Shepherd (1997) SP-A enhances uptake of bacillus Calmette-Guerin by macrophages through a specific SP-A receptor. *Am J Physiol.* **272**, L989-95.
- Weiss, A., J. Imboden, D. Shoback and J. Stobo (1984) Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**, 4169-73.
- Westhoff, T. H. and M. van der Giet (2007) Tacrolimus in the treatment of idiopathic nephrotic syndrome. *Expert Opin Investig Drugs.* **16**, 1099-110.
- White, M. K. and D. S. Strayer (2000) Surfactant protein A regulates pulmonary surfactant secretion via activation of phosphatidylinositol 3-kinase in type II alveolar cells. *Exp Cell Res.* **255**, 67-76.

- Whitsett, J. A., G. Ross, T. Weaver, W. Rice, C. Dion and W. Hull (1985) Glycosylation and secretion of surfactant-associated glycoprotein A. *J Biol Chem.* **260**, 15273-9.
- Wittwer, T., M. Grote, P. Oppelt, U. Franke, H. J. Schaefer and T. Wahlers (2001) Impact of PAF antagonist BN 52021 (Ginkgolide B) on post-ischemic graft function in clinical lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* **20**, 358-63.
- Wollina, U. (2007) The role of topical calcineurin inhibitors for skin diseases other than atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol.* **8**, 157-73.
- Wong, M. L., B. Xie, N. Beatini, P. Phu, S. Marathe, A. Johns, P. W. Gold, E. Hirsch, K. J. Williams, J. Licinio and I. Tabas (2000) Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: a possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 8681-6.
- Woo, M. S. (2008) Overview of lung transplantation. *Clin Rev Allergy Immunol.* **35**, 154-63.
- Woolley, S. M., A. S. Farivar, B. V. Naidu, M. Rosengart, R. Thomas, C. Fraga and M. S. Mulligan (2004) Endotracheal calcineurin inhibition ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **127**, 376-84.
- Wright, J. R. (1997) Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev.* **77**, 931-62.
- Wright, J. R. (2005) Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol.* **5**, 58-68.
- Wright, J. R., R. E. Wager, S. Hawgood, L. Dobbs and J. A. Clements (1987) Surfactant apoprotein Mr = 26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. *J Biol Chem.* **262**, 2888-94.
- Wright, J. R. and D. C. Youmans (1995) Degradation of surfactant lipids and surfactant protein A by alveolar macrophages in vitro. *Am J Physiol.* **268**, L772-80.
- Wu, H., A. Kuzmenko, S. Wan, L. Schaffer, A. Weiss, J. H. Fisher, K. S. Kim and F. X. McCormack (2003) Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest.* **111**, 1589-602.
- Wu, P. and L. Brand (1994) Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal Biochem.* **218**, 1-13.
- Wu, Y., S. Adam, L. Hamann, H. Heine, A. J. Ulmer, U. Buwitt-Beckmann and C. Stamme (2004) Accumulation of inhibitory kappaB-alpha as a mechanism contributing to the anti-inflammatory effects of surfactant protein-A. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **31**, 587-94.
- Yamada, C., H. Sano, T. Shimizu, H. Mitsuzawa, C. Nishitani, T. Himi and Y. Kuroki (2006) Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. *J Biol Chem.* **281**, 21771-80.
- Yang, C. W., H. J. Ahn, H. J. Han, W. Y. Kim, C. Li, M. J. Shin, S. K. Kim, J. H. Park, Y. S. Kim, I. S. Moon and B. K. Bang (2001) Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation.* **72**, 1753-9.
- Yang, C. H., J. Szeliga, J. Jordan, S. Faske, Z. Sever-Chroneos, B. Dorsett, R. E. Christian, R. E. Settlege, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, J. A. Whitsett and Z. C. Chroneos (2005) Identification of the surfactant protein A receptor 210 as the unconventional myosin 18A. *J Biol Chem.* **280**, 34447-57.

- Yang, H., V. C. McAlister, A. Al-Jazaeri and J. R. Wright, Jr. (2002) Liposomal encapsulation significantly enhances the immunosuppressive effect of tacrolimus in a discordant islet xenotransplant model. *Transplantation*. **73**, 710-3.
- Yano, I. (2008) Pharmacodynamic monitoring of calcineurin phosphatase activity in transplant patients treated with calcineurin inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet*. **23**, 150-7.
- Young, S. L., E. K. Fram and E. W. Larson (1992) Three-dimensional reconstruction of tubular myelin. *Exp Lung Res*. **18**, 497-504.
- Yu, S. H., F. X. McCormack, D. R. Voelker and F. Possmayer (1999) Interactions of pulmonary surfactant protein SP-A with monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol: roles of SP-A domains. *J Lipid Res*. **40**, 920-9.
- Yu, S. H. and F. Possmayer (1996) Effect of pulmonary surfactant protein A and neutral lipid on accretion and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine in surface films. *J Lipid Res*. **37**, 1278-88.
- Yu, S. H. and F. Possmayer (1998) Interaction of pulmonary surfactant protein A with dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol at the air/water interface. *J Lipid Res*. **39**, 555-68.
- Yukitake, K., C. L. Brown, M. A. Schlueter, J. A. Clements and S. Hawgood (1995) Surfactant apoprotein A modifies the inhibitory effect of plasma proteins on surfactant activity in vivo. *Pediatr Res*. **37**, 21-5.
- Zaltash, S., M. Palmblad, T. Curstedt, J. Johansson and B. Persson (2000) Pulmonary surfactant protein B: a structural model and a functional analogue. *Biochim Biophys Acta*. **1466**, 179-86.
- Zanoni, I., R. Ostuni, G. Capuano, M. Collini, M. Caccia, A. E. Ronchi, M. Rocchetti, F. Mingozzi, M. Foti, G. Chirico, B. Costa, A. Zaza, P. Ricciardi-Castagnoli and F. Granucci (2009) CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature*. **460**, 264-8.
- Zasadzinski, J. A., T. F. Alig, C. Alonso, J. B. de la Serna, J. Perez-Gil and H. W. Tausch (2005) Inhibition of pulmonary surfactant adsorption by serum and the mechanisms of reversal by hydrophilic polymers: theory. *Biophys J*. **89**, 1621-9.
- Zenati, M., S. A. Yousem, R. D. Dowling, K. L. Stein and B. P. Griffith (1990) Primary graft failure following pulmonary transplantation. *Transplantation*. **50**, 165-7.
- Zhang, R., R. He, J. Qian, J. Guo, K. Xue and Y. F. Yuan (2010) Treatment of Experimental Autoimmune Uveoretinitis with Intravitreal Injection of Tacrolimus (FK506) Encapsulated in Liposomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Zimmerman, G. A. and T. M. McIntyre (2004) PAF, ceramide and pulmonary edema: alveolar flooding and a flood of questions. *Trends Mol Med*. **10**, 245-8.
- Zuo, Y. Y. and F. Possmayer (2007) How does pulmonary surfactant reduce surface tension to very low values? *J Appl Physiol*. **102**, 1733-4.
- Zuo, Y. Y., R. A. Veldhuizen, A. W. Neumann, N. O. Petersen and F. Possmayer (2008) Current perspectives in pulmonary surfactant--inhibition, enhancement and evaluation. *Biochim Biophys Acta*. **1778**, 1947-77.

